

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2014/089647 A1**

(43) Data de Publicação Internacional  
19 de Junho de 2014 (19.06.2014) **WIPO | PCT**

- (51) Classificação Internacional de Patentes :  
*G01N 33/483* (2006.01) *G06T 1/40* (2006.01)  
*C12N 5/073* (2010.01) *A61D 19/00* (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional : PCT/BR2013/000506
- (22) Data do Depósito Internacional : 22 de Novembro de 2013 (22.11.2013)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade : BR1020120319535  
14 de Dezembro de 2012 (14.12.2012) BR
- (71) Requerente : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" [BR/BR]; Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP-01049-010 São Paulo/SP (BR).
- (72) Inventores : DELESTRO MATOS, Felipe; Av. Dom Antonio, nº 2100, Parque Universitário, CEP-19.806-900 Assis - SP (BR). GOUVEIA NOGUEIRA, Marcelo Fabio; Av. Dom Antonio, nº 2100, Parque Universitário, CEP-19.806-900 Assis - SP (BR). CELSO ROCHA, José; Av. Dom Antonio, nº 2100, Parque Universitário, CEP-19.806-900 Assis - SP (BR).
- (74) Mandatário : SPIANDORELLO, Fabíola de Moraes; Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271, Bloco 2, Barra Funda, CEP-01140-070 São Paulo/SP (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : METHOD FOR DETERMINING EMBRYO VIABILITY AND QUALITY

(54) Título : MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES

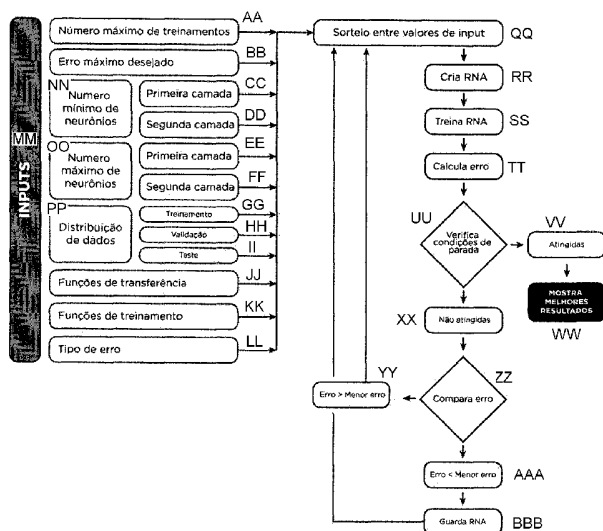


Figura 9

- |                                |                              |
|--------------------------------|------------------------------|
| AA Maximum number of trainings | OO Maximum number of neurons |
| BB Maximum desirable error     | PP Data distribution         |
| CC First layer                 | QQ Input value allotment     |
| DD Second layer                | RR RNA creation              |
| EE First layer                 | SS RNA training              |
| FF Second layer                | TT Error calculation         |
| GG Training                    | UU Check of stop conditions  |
| HH Validation                  | VV Conditions met            |
| II Test                        | WW DISPLAY OF BEST RESULTS   |
| JJ Transfer functions          | XX Conditions not met        |
| KK Training functions          | YY Error > Lowest error      |
| LL Error type                  | ZZ Error comparison          |
| MM INPUTS                      | AAA Error < Lowest error     |
| NN Minimum number of neurons   | BBB RNA stored               |

(57) Abstract : The invention described is a method for determining embryo viability and quality that makes a quick evaluation possible, with minimal interference in the development of the embryo, using a microscopy system associated with digital image capture, providing a set of values for each embryo which represents to what extent the embryo can be considered to belong to each of the four possible grades, using artificial neural network technology, with objectivity and reproducibility.

(57) Resumo : É descrita a invenção de um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que permite uma avaliação rápida e com mínima interferência no desenvolvimento embrionário, utilizando um sistema de microscopia associado à captura digital de imagens, provendo um conjunto de valores para cada embrião que representa o quanto o embrião está apto a ser considerado em cada um dos quatro graus possíveis, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais, provendo objetividade e reprodutibilidade.



RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(84) Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY,

**Publicado:**

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

## MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método para determinação da  
5 viabilidade e qualidade de embriões. Mais especificamente  
compreende um método que permite determinar a qualidade de  
embriões a partir da análise morfológica de uma figura bidimensional,  
utilizando a técnica de redes neurais artificiais (RNA), provendo um  
índice de qualidade objetivo e reprodutível.

### 10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Desde o desenvolvimento das primeiras técnicas bem sucedidas  
de fertilização artificial e transferência embrionária em embriões de  
mamíferos, tornou-se visível uma relação direta da qualidade  
embrionária com a taxa de sucesso das transferências destes  
15 embriões em fêmeas receptoras, sendo que embriões  
morfológicamente classificados como de qualidade alta possuem uma  
maior taxa de sucesso (H.R. Tervit, M.W. Cooper, Pamela G. Goold,  
G.M. Haszard, Non-surgicalembryotransfer in cattle, *Theriogenology*,  
Volume 13, Issue 1, January 1980, Pages 63-71, ISSN 0093-691X,  
20 10.1016/0093-691X(80)90015-1) e (H.J. Schneider Jr., R.S.  
Castleberry, J.L. Griffin, Commercial aspects of bovine embryo  
transfer, *Theriogenology*, Volume 13, Issue 1, January 1980, Pages  
73-85, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(80)90016-3).

A classificação morfológica embrionária possui grande  
25 importância para inúmeras técnicas laboratoriais, de pesquisa básica  
a aplicadas na reprodução assistida. É a partir dela que podem ser  
inferidas taxas de sucesso (gestação), de utilização de biotécnicas  
associadas (criopreservação, biópsia, bipartição, microinjeção etc.) ou

mesmo de padronização dos embriões utilizados em experimentos científicos.

Para tanto, foram desenvolvidos métodos de padronização dos elementos que categorizam os embriões em diferentes graus de acordo com sua qualidade (e, portanto, também segundo sua viabilidade), sendo atualmente amplamente utilizado o sistema de quatro graus: Excelente (Excellent), Bom (Good), Regular (Fair) e Ruim ou Pobre (Poor) (Gary M. Lindner, Raymond W. Wright Jr., Bovineembryomorphologyandevaluation, *Theriogenology*, Volume 20, Issue4, October 1983, Pages 407-416, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(83)90201-7) e (R.W. Wright Jr., J. Ellington, Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro- produced pre implantatio nembryos from live stock species, *Theriogenology*, Volume 44, Issue 8, December 1995, Pages 1167-1189, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(95)00327-5). Esse sistema se baseia na análise qualitativa morfológica visual do embrião, comumente feita por meio de microscopia óptica (estereomicroscópio). A técnica depende da experiência e acurácia do embriologista em analisar e categorizar desde os evidentes fatores até as nuances que tornam um embrião mais ou menos apto ao desenvolvimento. Nessa análise morfológica clássica, tais fatores não são objetivamente mensurados, de forma que se torna subjetiva e de baixa repetibilidade (BalázsBényei, IstvánKomlósi, Anna Pécsi, GeoffryPollott, Cruvinel Heraldo Marcos, Alexandre de Oliveira Campos, Maida Paula Lemes, The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment, *Animal Reproduction Science*, Volume 93, Issues 3–4, July 2006, Pages 268-279, ISSN 0378-4320, 10.1016/j.anireprosci.2005.07.012).

Disso resulta que um mesmo embrião mensurado por diferentes especialistas pode obter diferentes graus de classificação. Tal discordância ocorre principalmente entre graus próximos, como entre embriões bons e excelentes (P.W. Farin, J.H. Britt, D.W. Shaw, B.D. Slenning, Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro, *Theriogenology*, Volume 44, Issue3, August 1995, Pages 339-349, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(95)00189-F).

Buscando soluções para a questão da subjetividade da análise morfológica, diversos métodos alternativos foram desenvolvidos. Dentre eles podem ser destacados o cultivo in vitro de embriões, integridade da membrana blastomérica, análise do metabolismo embrionário (Eric W. Overström, In vitro assessment of embryo viability, *Theriogenology*, Volume 45, Issue 1, 1 January 1996, Pages 3-16, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(96)84625-5.), mensuração da respiração celular (HiroyoshiHoshi, In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer, *Theriogenology*, Volume 59, Issue 2, 15 January 2003, Pages 675-685, ISSN 0093-691X, 10.1016/S0093-691X(02)01247-5), análise com microscopia eletrônica (López-Damián E. P, Galina C. S., Merchant H., Cedillo-Peláez C., Aspron M., Assessment of Bostaurus embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 2 (3), pp. 072–078, March 2008, ISSN 1996-0867© 2008 AcademicJournals) e uso de índices de birrefringência da zona pelúcida (Held, Eva, Mertens, Eva-Maria, Mohammadi-Sangcheshmeh, Abdollah, Salilew-Wondim, Dessie, Besenfelder, Urban, Havlicek, Vitezslav, Herrler, Andreas, Tesfaye, Dawit, Schellander, Karl, and Hölker, Michael (2011). Zonapellucida birefringence correlates with developmental capacity of

bovine oocytes classified by maturational environment, COC morphology and G6PDH activity. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 568–579).

Entretanto, nenhum método até o momento apresentou uma solução definitiva para a mensuração de qualidade e viabilidade, sendo ainda necessário o desenvolvimento de métodos que sejam  
5 rápidos, não invasivos e objetivos.

Outro fator a ser analisado é o alto custo de alguns métodos, o que impede sua ampla utilização. Assim, apesar da subjetividade e baixa repetibilidade, a análise morfológica visual continua sendo  
10 amplamente utilizada para a determinação da qualidade embrionária.

Portanto, a presente invenção descreve um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que permite uma avaliação rápida e com mínima interferência no desenvolvimento embrionário, pois é necessário um sistema de microscopia associado  
15 à captura digital de imagens, provendo um conjunto de valores para cada embrião que representa o quanto o embrião está apto a ser considerado em cada um dos quatro graus possíveis, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais, provendo objetividade e reprodutibilidade.

## 20 **SUMÁRIO**

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões a partir da análise morfológica de uma figura bidimensional, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais (RNA).

25 É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que fornece como resultado um índice de qualidade embrionária de modo objetivo e reprodutível.

É característica da invenção um método para determinação da

viabilidade e qualidade de embriões com potencial aplicação em pesquisa científicas envolvendo embriões de camundongos/ratos, na classificação da qualidade de embriões bovinos produzidos para o uso comercial (produção *in vitro*), bem como para a avaliação da  
5 qualidade embrionária de embriões humanos em clínicas de reprodução assistida.

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões baseada na objetividade da análise e que independe da qualidade do microscópio, da experiência  
10 do embriologista e da capacidade restrita dos graus de qualidade embrionária, classicamente utilizados para a avaliação.

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que não danifica os embriões, não é invasiva e pode ser realizada em pouco tempo, permitindo que  
15 o avaliador "interprete" a resposta, de modo que a experiência clínica individual pode maximizar o resultado obtido pelo método.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1 apresenta a representação da marcação da medida do primeiro diâmetro do embrião (DE1).

20 A figura 2 apresenta a representação da marcação da medida do segundo diâmetro do embrião (DE2).

A figura 3 apresenta a representação da marcação do Primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1).

A figura 4 apresenta a representação da marcação do Segundo  
25 diâmetro da zona pelúcida (DZP2).

A figura 5 apresenta a representação da marcação da área do embrião (AE).

A figura 6 apresenta a representação da marcação da Área da

zona pelúcida (AZP).

A figura 7 apresenta a representação da marcação da Área de células mortas (ACM).

5 A figura 8 apresenta a marcação da Densidade de cor da zona pelúcida (DCZP).

A figura 9 apresenta o fluxograma do método utilizado para avaliação da arquitetura de RNA.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

10 O método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, objeto da presente invenção, permite a avaliação morfológica de embriões de forma objetiva, mediante a extração de informações a partir de imagens dos embriões e sua posterior análise através de um programa de computador baseado em Redes Neurais Artificiais (RNA), uma técnica de Inteligência Artificial indicada para a  
15 resolução de problemas não lineares e com variáveis interconectadas (Guoqiang Zhang, B. Eddy Patuwo, Michael Y. Hu, Forecasting with artificial neural networks: The state of the art, *International Journal of Forecasting*, Volume 14, Issue 1, 1 March 1998, Pages 35-62, ISSN 0169-2070, 10.1016/S0169-2070(97)00044-7) e (Eldon Y. Li, Artificial  
20 neural networks and their business applications, *Information & Management*, Volume 27, Issue 5, November 1994, Pages 303-313, ISSN 0378-7206, 10.1016/0378-7206(94)90024-8).

Basicamente, uma Rede Neural Artificial é um sistema que atua na resolução de problemas, simulando o funcionamento de um  
25 conjunto de neurônios biológicos. Tais neurônios da RNA (também chamados de perceptrons) precisam ser expostos a dados de treinamento, de forma a aprenderem a generalizar uma saída a partir de um conjunto de dados de entrada. Uma vez devidamente treinada,

a RNA é capaz de realizar predições, sem os dados de saída (Guoqiang Zhang, B. Eddy Patuwo, Michael Y. Hu, Forecasting with artificial neural networks: The state of the art, *International Journal of Forecasting*, Volume 14, Issue 1, 1 March 1998, Pages 35-62, ISSN 5 0169-2070, 10.1016/S0169-2070(97)00044-7) e (Haykin, S. , *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2nd edition, Prentice Hall, 1999 ISBN: 0132733501).

No presente método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, as informações são extraídas da imagem do embrião mediante um protocolo, sendo em seguida processadas por um programa de computador que trabalha os dados recebidos, transformando-os em variáveis de entrada para a RNA e realiza o processamento, fornecendo como resultado um índice de qualidade embrionária nos mesmos padrões que um embriologista forneceria 15 (graus "Excelente", "Bom", "Regular" e "Ruim").

Em uma primeira etapa do método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, são obtidas imagens do embrião, sendo preferentemente selecionadas imagens de blastocistos, desde a fase de blastocisto inicial até blastocisto expandido.

20 Necessariamente, a imagem deve apresentar integralmente o embrião, com nitidez da zona pelúcida e a delimitação da blastocele devendo estar visível.

Em uma segunda etapa, a imagem do embrião é processada por um software de processamento de imagens, sendo obtidas 25 mensurações a partir da seleção de pontos da imagem.

As variáveis obtidas utilizando o programa de computador de processamento de imagens compreendem:

a) Primeiro diâmetro do embrião (DE1), que compreende a

medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que une os pontos mais extremos do embrião, não levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 1);

b) Segundo diâmetro do embrião (DE2), que compreende a  
5 medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha aproximadamente perpendicular à linha DE1, que liga os pontos mais extremos do embrião, não levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 2);

c) Primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1), que compreende  
10 a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que liga os pontos mais extremos do embrião, levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 3);

d) Segundo diâmetro da zona pelúcida (DZP2), que compreende  
15 a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha perpendicular à DZP1, ligando os pontos mais extremos do embrião e levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 4);

e) Área do embrião (AE), sendo feito um contorno que envolve toda a área do embrião (sem ser considerada a área da zona pelúcida). A precisão dessa seleção é importante, pois várias  
20 informações são extraídas da mensuração de área (Área do embrião, densidade de cor do embrião, circularidade do embrião) (Figura 5);

f) Área da zona pelúcida (AZP), sendo feito um contorno que envolve toda a área do embrião, sendo considerada a área da zona pelúcida. A precisão dessa seleção é importante, pois várias  
25 informações são extraídas da mensuração de área (Área da zona pelúcida, densidade de cor total, circularidade da zona pelúcida) (Figura 6);

g) Área de células mortas (ACM), sendo feito um contorno que

envolve toda a área de células mortas, devendo ser incluídas tanto células mortas que se apresentem ainda aderidas como soltas do embrião (Figura 7);

h) Densidade de cor da zona pelúcida (DCZP), sendo feito um contorno que envolve somente a área da zona pelúcida, sem incluir a área do embrião. Esta variável não precisa ser obtida se o espaço perivitelino for ausente, pois nesse caso específico pode ser calculada através de AE (área do embrião) e AZP (área da zona pelúcida) (Figura 8).

Em uma terceira etapa, as variáveis obtidas pelo programa de computador para análise de imagens são processadas para servirem de entrada na RNA, sendo armazenadas em um banco de dados.

O dado referente ao diâmetro do embrião (DE) é obtido pela fórmula 1.

Fórmula 1: diâmetro do embrião (DE)

$$DE = \frac{DE1 + DE2}{2}$$

O dado referente ao diâmetro da zona pelúcida (DZP) é obtido pela fórmula 2.

Fórmula 2: diâmetro da zona pelúcida (DZP)

$$DZP = \frac{DZP1 + DZP2}{2}$$

O dado referente à área de células vivas (ACV) é obtido pela fórmula 3.

Fórmula 3: ACV (Área de células vivas)

$$ACV = AE - ACM$$

O dado referente à densidade de cor do embrião (DCE) é obtido pelo primeiro programa de computador juntamente com a área do

embrião (AE).

O dado referente à densidade de cor total (DCTotal) é obtido pelo primeiro programa de computador juntamente com a área da zona pelúcida (AZP).

- 5 O dado referente à densidade de cor da zona pelúcida (DCZP) é obtido pela fórmula 4

$$DCZP = \frac{(DCTotal \times AZP) - (DCE \times AE)}{(AZP - Ae)}$$

Onde:

DCZP é a cor média da zona pelúcida,

- 10 DCTotal é a cor média da zona pelúcida juntamente com o embrião

AZP é a área da zona pelúcida juntamente com a do embrião

DCE é a cor média do embrião

AE é a área do embrião

- 15 O dado referente à circularidade do embrião (CE) é obtido juntamente com área do embrião (AE).

O dado referente à Circularidade da zona pelúcida (CZP) é obtido juntamente com Área da Zona Pelúcida (AZP).

- 20 O dado referente à Fase do Desenvolvimento Embrionário (EDE) é obtido pela análise morfológica visual do embrião, sendo três valores possíveis: EDE=0,0 no caso de blastocisto inicial, FDE=0,5 no caso de blastocito e EDE=1,0 no caso de blastócito expandido, devido à diferença morfológica dos embriões no decorrer de seu desenvolvimento pré-implantacional (de zigoto a blastocisto).

- 25 O dado referente a Dias Pós-cópula (DPC) compreende o tempo (em dias) decorridos desde a cópula do mamífero gerador do embrião. Este dado é relevante a fim de permitir a comparação entre o estágio

que o embrião está (EDE) e o estágio ideal para o tempo decorrido desde a fertilização.

O dado referente à Relação com a Média do Grupo (RMG) compreende a relação entre a fase de desenvolvimento (EDE) e a Média do Grupo, determinada pela fórmula 5. Dessa forma, valores maiores que 1 indicarão que o embrião está adiantado em relação ao seu grupo, enquanto que valores menores do que 1 indicarão que o embrião está atrasado em relação ao seu grupo.

Fórmula 5: relação com a média do grupo (RMG):

$$RMG = \frac{EDE}{EDE_{grupo}}$$

Onde:

EDE grupo corresponde à média da fase embrionária de todos os outros embriões da mesma colheita.

O grau de rugosidade ou de granulação dos embriões (EDG) é obtido através de um macro para o programa de computador, permitindo identificar as regiões de contraste no embrião e contar estas regiões, de forma a representar numericamente essa característica visual.

O macro denominado de Sharp Edges (EDG) utiliza as operações básicas Sharpen e FindEdges de um software de análise de imagens, sendo constituído pelas operações:

```
run("UnsharpMask...", "radius=10 mask=0.50");
```

```
run("FindEdges");
```

Após, deve ser utilizada a opção FindMaxima (Noise:100 ; Sem light background).

O dado de relação de diâmetro médio (RDM) do embrião é obtido pela fórmula 6, onde DE (diâmetro do embrião) e DZP (diâmetro da

zona pelúcida) são obtidos por meio da média entre o maior e o menor diâmetro, respectivamente para o embrião e a zona pelúcida, favorecido pela grande constância do diâmetro da zona pelúcida, quando comparada com a do embrião propriamente dito.

5        Fórmula 6: relação de diâmetro médio (RDM)

$$RDM = \frac{DE}{DZP}$$

O dado referente à relação de células vivas (RCV) é obtido pela fórmula 7.

Fórmula 7: relação de células vivas (RCV)

$$RCV = \frac{ACV}{AZP}$$

10        O dado referente à Relação de Células Mortas (RCM) é obtido através da fórmula 8. Quanto maior o valor de RCM, maior será a proporção de células mortas no embrião, o que terá um impacto negativo em sua qualidade.

Fórmula 8: relação de células mortas (RCM)

$$RCM = \frac{ACM}{ACV}$$

15        O dado referente à relação de densidade de cor do embrião (RDC) é obtido através da fórmula 9. A cor do embrião é um fator importante a ser analisado, pois é diretamente influenciado pela sua densidade de células e como está a viabilidade destas. Esta variável é altamente dependente das condições nas quais foi obtida a imagem. Entretanto, estas variações são compensadas quando é estabelecida  
20        uma relação da cor do embrião (DCE) com a da zona pelúcida (DCZP).

Fórmula 9: relação de densidade de cor do embrião (RDC)

$$RDC = \frac{DCE}{DCZP}$$

Valores de RDC menores que 1 indicam um embrião mais claro que a sua zona pelúcida, enquanto que valores maiores do que 1 um embrião mais escuro.

5 A intensidade de cor (DCE e DCZP) é medida pela média dos valores de brilho de cada pixel da área em questão. Este valor varia de 0 para completamente escuro até 255 para completamente branco.

O dado referente à Relação de circularidade ao quadrado (RCE2) é obtido pela fórmula 10.

Fórmula 10: relação de circularidade (RCE)

$$RCE2 = \left( \frac{CE}{CZP} \right)^2$$

10 Um círculo ideal terá um valor igual a 1. Quanto mais próximo de zero, menos a forma mensurada se assemelha a um círculo.

A circularidade é definida como  $RCE = CE/CZP$ , onde CE é a circularidade do embrião e CZP é a circularidade da zona pelúcida.

15 Como a zona pelúcida é constante e muito circular, valores próximos a 1 indicam uma circularidade alta do embrião, enquanto valores próximos a 0 indicam uma circularidade muito baixa.

No entanto, para fins de atribuição de características diferentes a embriões circulares ou pouco circulares por parte da RNA, tendo em vista que os valores são sempre muito próximos de 1, é utilizada a RCE2 (razão de circularidade elevada ao quadrado) de modo a 20 ressaltar as diferenças numericamente pequenas de circularidade, onde os embriões mais circulares continuam tendendo a 1.

O dado referente à qualidade embrionária (Q) varia em uma escala de Excelente, Bom, Regular e Ruim, sendo utilizado como

gabarito para o treinamento da Rede Neural Artificial. A RNA possui 4 neurônios em sua camada de saída, cada um representando uma das possíveis classes de qualidade (Neurônios com valores 0 ou 1).

Em uma quarta etapa, é desenvolvida a arquitetura de RNA, com  
5 definição da quantidade de camadas, número de neurônios nas camadas, funções de transferência entre os neurônios e funções de treinamento.

A estrutura de uma Rede Neural é composta de diversos elementos, como a quantidade de camadas de neurônios, a  
10 quantidade de neurônios em cada camada, suas funções de transferência e função de treinamento da rede. Embora a correta determinação desses fatores seja de suma importância para o melhor desenvolvimento da RNA, não há um protocolo fixo para a determinação da melhor arquitetura (Xin Yao, Yong Liu, Towards  
15 designing artificial neural networks by evolution, *Applied Mathematics and Computation*, Volume 91, Issue1, April 1998, Pages 83-90, ISSN 0096-3003, 10.1016/S0096-3003(97)10005-4).

O programa foi executado, tendo como condição de parada 10.000 ciclos, intervalo de 5 a 20 neurônios na primeira e segunda  
20 camadas, sorteio de funções de transferência entre tansig, logsig e purelin e sorteio de funções de treinamento entre trainlm, trainscg e traingdx. O erro foi calculado com confusion matrix (porcentagem de classificações errôneas). A RNA desenvolvida utilizando-se o algoritmo de backpropagation.

25 Assim, foi obtida a melhor arquitetura de RNA para este caso específico, sendo uma rede com 18 neurônios na primeira camada e função de transferência purelin (função linear), 13 neurônios na segunda camada e função de transferência logsig (função logística). A

função de treinamento, escolhida pelo algoritmo, foi `trainscg` (`ScaledConjugateGradientAlgorithm`).

Conforme apresentado na figura 9, as entradas (inputs) compreendem variáveis utilizadas para criar as diferentes  
5 configurações da RNA. O programa de computador sorteia valores para todas as variáveis e cria uma RNA que é treinada com o banco de dados definido na terceira etapa do presente método contendo os dados relativos aos embriões, utilizando a divisão dos dados em treinamento, validação e teste de acordo com a escolha no início do  
10 programa. Tal processo ocorre ciclicamente, sendo que a cada ciclo o programa compara o erro da rede atual com as redes passadas, guardando a RNA com o menor erro. Uma vez atingida alguma das variáveis de parada, o programa encerra o ciclo e mostra o melhor resultado.

15 A seguir, é utilizada uma interface gráfica dotada de campos para entrada das variáveis obtidas por meio do programa de análise de imagens, sendo realizada a padronização das variáveis e uma simulação com a RNA previamente treinada.

As variáveis de entrada da RNA compreendem o EDE (Estágio do  
20 Desenvolvimento Embrionário), o DPC (Dias Pós Cópula), o RMG (Relação entre estágio de desenvolvimento e a Média do Grupo), o RDM (Relação entre Diâmetro Médio do embrião e da zona pelúcida), o RCV (Relação entre área de Células Vivas com a área total), o RCM (Relação entre área de Células Mortas com a área de células vivas),  
25 RDC (Relação entre Densidade de Cor do embrião), o RCE2 (Relação entre Circularidade do Embrião e da zona pelúcida ao quadrado), o EDG (Macro Sharp EDGes), o RAB (Relação entre Área da Blastoclele e área do embrião), o RDCB (Relação entre Densidade de Cor da

Blastocele com a densidade de cor do embrião), o RCB2 (Relação entre Circularidade da Blastocele e circularidade do embrião ao quadrado).

A avaliação da qualidade embrionária por RNA pode ser apresentada mediante um gráfico de barras, que representa cada uma das saídas da RNA (os 4 graus de qualidade), sendo a altura de cada barra determinada pela magnitude do valor da saída; e/ou através de um índice de qualidade, de acordo com o maior valor de saída da rede, sendo os resultados preferentemente apresentado como Excelente, Bom, Regular e Ruim; e/ou um vetor descritivo, que é o vetor real de saída da RNA, representando os valores dos quatro neurônios da camada de saída (“Excelente”, “Bom”, “Regular” e “Ruim”, respectivamente).

A Tabela 1 apresenta os resultados da RNA para os dados de Teste. A coluna ID representa a identificação do embrião no banco de dados. A coluna erro foi calculada pela subtração da qualidade fornecida pela RNA em relação a qualidade fornecida como gabarito (avaliação do embriologista), de forma que 0 indica um acerto, +1 que a RNA atribuiu uma qualidade inferior à do gabarito e -1 que a RNA atribuiu uma qualidade superior à do gabarito.

*TABELA 1: Resultados da RNA para os dados de Teste. As quatro saídas da RNA representam os graus de qualidade do embrião analisado, sendo 1 (excelente), 2 (bom), 3 (regular) e 4 (ruim).*

ID	Saídas da RNA				Qualidade RNA	Qualidade Gabarito	Erro
	1	2	3	4			
003D	0,11	0,84	0,03	0,01	2	1	1
004E	0,45	0,64	0,00	0,00	2	2	0
004F	0,83	0,10	0,01	0,01	1	2	-1
004G	0,86	0,09	0,01	0,01	1	2	-1
008C	0,53	0,40	0,11	0,00	1	1	0

008D	0,21	0,62	0,05	0,00	2	2	0
011A	0,75	0,27	0,02	0,00	1	1	0
012C	0,47	0,48	0,11	0,00	2	2	0
013G	0,84	0,13	0,01	0,00	1	1	0
015A	0,55	0,47	0,05	0,00	1	1	0
016B	0,94	0,04	0,02	0,00	1	1	0
016D	0,37	0,63	0,02	0,01	2	2	0
016E	0,74	0,07	0,21	0,00	1	1	0
017F	0,21	0,85	0,02	0,00	2	1	1
024C	0,22	0,79	0,03	0,00	2	2	0
027B	0,63	0,04	0,34	0,00	1	1	0
027J	0,00	0,20	0,18	0,90	4	3	1
028I	1,00	0,00	0,00	0,01	1	1	0
029F	0,00	0,58	0,58	0,15	2	2	0
029E	0,00	0,27	0,51	0,14	3	3	0

## REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES caracterizado por compreender as etapas de:

- 5 a) obtenção da imagem digital do embrião;
- b) processamento da imagem digital do embrião em um programa de computador de processamento de imagens, com obtenção das mensurações a partir da seleção de pontos da imagem;
- 10 c) obtenção das variáveis:
- c.1) primeiro diâmetro do embrião (DE1), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que une os pontos mais extremos do embrião;
- c.2) segundo diâmetro do embrião (DE2), que compreende a  
15 medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha aproximadamente perpendicular à linha DE1, que liga os pontos mais extremos do embrião;
- c.3) primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através  
20 de uma linha que liga os pontos mais extremos do embrião, levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida;
- c.4) segundo diâmetro da zona pelúcida (DZP2), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através  
25 de uma linha perpendicular à DZP1, ligando os pontos mais extremos do embrião e levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida;
- c.5) área do embrião (AE), sem ser considerada a área da zona pelúcida;

- c.6) área da zona pelúcida (AZP), sendo considerada a área da zona pelúcida;
- c.7) área de células mortas (ACM);
- c.8) densidade de cor da zona pelúcida (DCZP);
- 5 d) processamento das variáveis obtidas, para servirem de entrada na Rede Neural Artificial, sendo:
- d.1) diâmetro do embrião (DE) obtido pela fórmula  $DE = \frac{DE1+DE2}{2}$ ;
- d.2) diâmetro da zona pelúcida (DZP) obtido pela fórmula  
10  $DZP = \frac{DZP1+DZP2}{2}$ ;
- d.3) área de células vivas (ACV) obtida pela fórmula  $ACV = AE - ACM$ ;
- d.4) densidade de cor do embrião (DCE) obtida juntamente com a área do embrião (AE);
- 15 d.5) densidade de cor total (DCTotal) obtida juntamente com a área da zona pelúcida (AZP);
- d.6) densidade de cor da zona pelúcida (DCZP) obtida pela fórmula  $DCZP = \frac{(DCTotal \times AZP) - (DCE \times AE)}{(AZP - Ae)}$ ;
- d.7) circularidade do embrião (CE) obtida juntamente com  
20 área do embrião (AE);
- d.8) circularidade da zona pelúcida (CZP) obtida juntamente com Área da Zona Pelúcida (AZP);
- d.9) fase do Desenvolvimento Embrionário (EDE) obtido pela análise morfológica visual do embrião, sendo EDE=0,0 no  
25 caso de blastocisto inicial, FDE=0,5 no caso de blastócito e EDE=1,0 no caso de blastócito expandido;

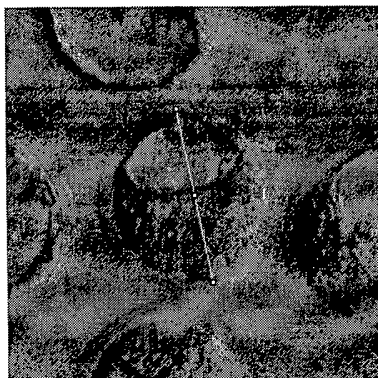
- d.10) dias Pós-cópula (DPC) compreende o tempo (em dias) decorridos desde a cópula do mamífero gerador do embrião;
- d.11) relação com a média do grupo (RMG) compreende a relação entre a fase de desenvolvimento (EDE) e a Média do Grupo, determinada pela fórmula  $RMG = \frac{EDE}{EDE_{grupo}}$ ;
- 5
- d.12) grau de rugosidade ou de granulação dos embriões (EDG) obtido por meio de um macro para o programa de computador de processamento de imagens;
- d.13) relação de diâmetro médio (RDM) do embrião é obtida
- 10
- pela fórmula  $RDM = \frac{DE}{DZP}$ ;
- d.14) relação de células vivas (RCV) obtida pela fórmula  $RCV = \frac{ACV}{AZP}$ ;
- d.15) relação de Células Mortas (RCM) obtida através da fórmula  $RCM = \frac{ACM}{ACV}$ ;
- 15
- d.16) relação de densidade de cor do embrião (RDC) obtida através da fórmula  $RDC = \frac{DCE}{DCZP}$ ;
- d.17) relação de circularidade ao quadrado (RCE2) obtido pela fórmula  $RCE2 = \left(\frac{CE}{CZP}\right)^2$ ;
- e) desenvolvimento da arquitetura de Rede Neural Artificial, com
- 20
- definição da quantidade de camadas, número de neurônios nas camadas, funções de transferência entre os neurônios e funções de treinamento;
- f) padronização das variáveis e simulação com a RNA previamente treinada, utilizando-se uma interface gráfica

dotada de campos para entrada das variáveis obtidas através do programa de computador para análise de imagens;

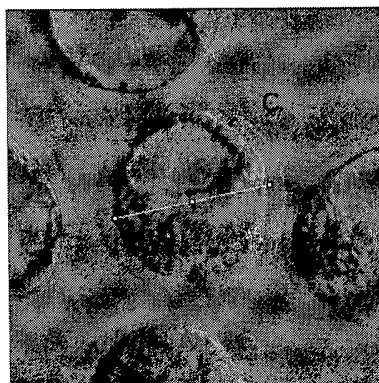
g) avaliação da qualidade embrionária por Rede Neural Artificial.

2. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de preferentemente a imagem digital ser selecionada de blastocistos.
3. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da imagem digital do embrião apresentar a zona pelúcida com nitidez e a delimitação da blastocele.
4. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da avaliação da qualidade embrionária por Rede Neural Artificial ser apresentada mediante um gráfico de barras, que representa cada uma das saídas da RNA, sendo a altura de cada barra determinada pela magnitude do valor da saída; e/ou através de um índice de qualidade, de acordo com o maior valor de saída da rede, sendo os resultados preferentemente apresentado como Excelente, Bom, Regular e Ruim; e/ou um vetor descritivo, que é o vetor real de saída da RNA, representando os valores dos quatro neurônios da camada de saída (“Excelente”, “Bom”, “Regular” e “Ruim”, respectivamente).

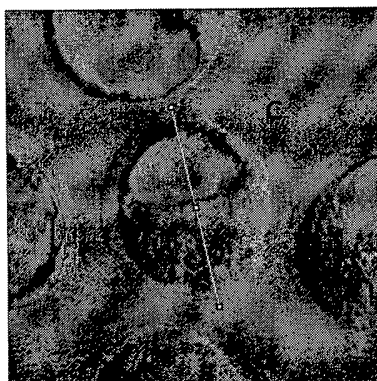
1 / 4



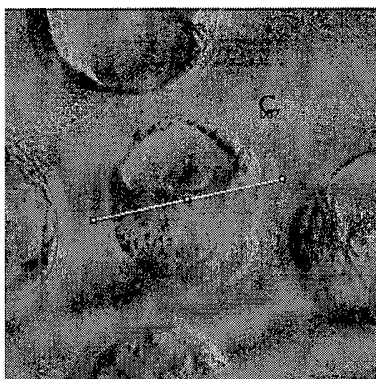
**Figura 1**



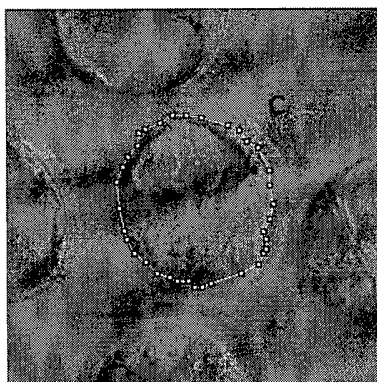
**Figura 2**



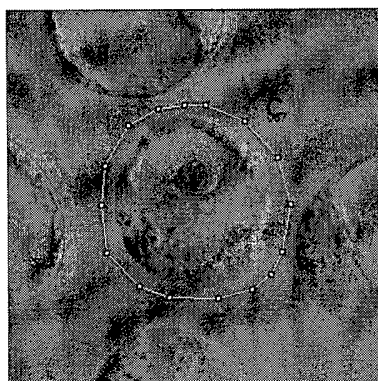
**Figura 3**



**Figura 4**



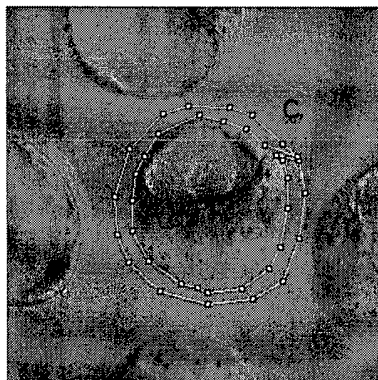
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**

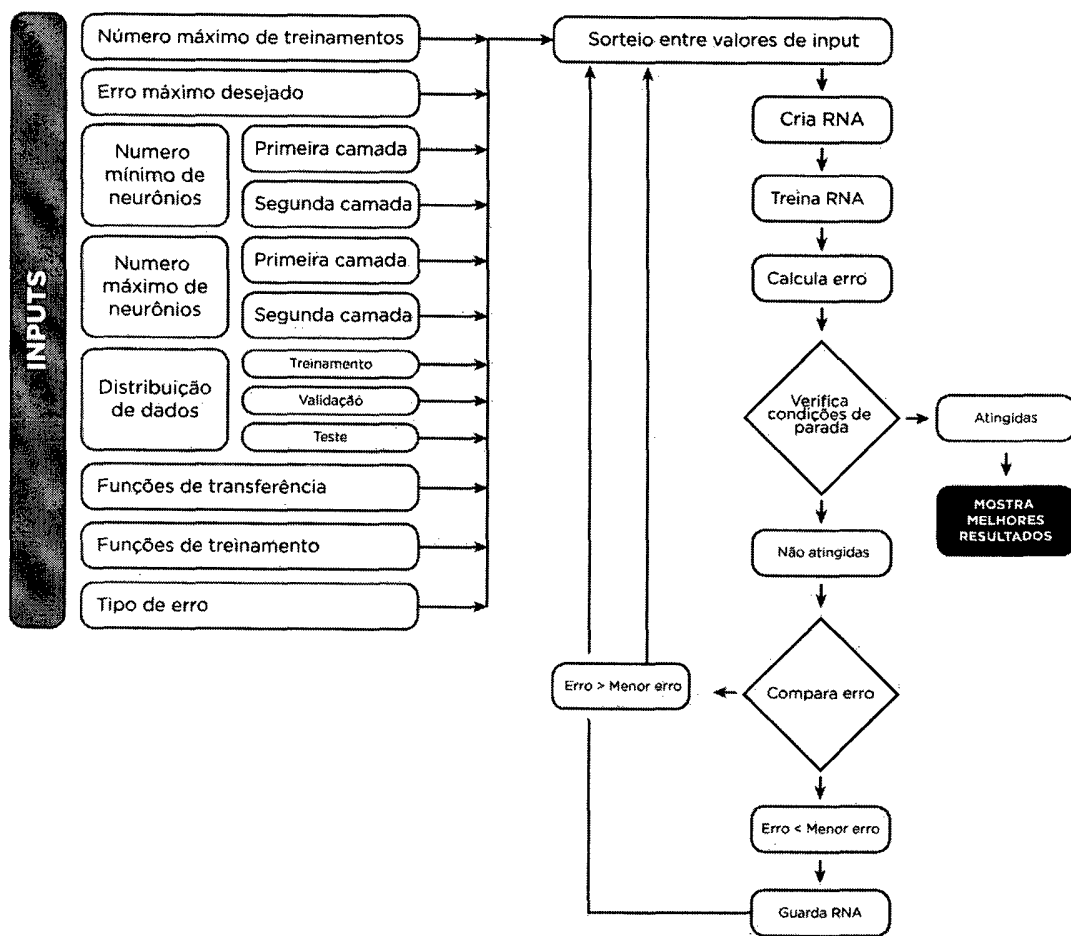


Figura 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000506

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**G01N 33/483 (2006.01), C12N 5/073 (2010.01), G06T 1/40 (2006.01), A61D 19/00 (2006.01)**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC G01N**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, MEDLINE, WPI DATA**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Filho ES, Noble JA, Poli M, Griffiths T, Emerson G, Wells D. A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. <b>Hum Reprod.</b> , 27(9):2641-8. 2012 Sep see pages 2642 to 2644 - "Methods",	
A	Manna C, Patrizi G, Rahman A, Sallam H. Experimental results on the recognition of embryos in human assisted reproduction. <b>Reprod Biomed Online</b> , 8(4):460-9. 2004 Apr; see page 460 to 462	
A	A. De Kock, M.P. Smuts, J.D. Madden, A.J. Rodriguez, S.J. Chantilis, M. Meintjes. Digital image analyses of blastocysts. Morphometric correlations with pregnancy outcome. <b>Fertility and Sterility</b> , 86(3):S51 -S52. 07/2006 see the whole document	

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

**31/01/2014**

Date of mailing of the international search report

**07/02/2014**

Name and mailing address of the ISA/

**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA  
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Facsimile No.

Authorized officer

**Julia Cordeiro Fontanella**

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000506

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Filho ES, Noble JA, Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. <b>Open Biomed Eng J.</b> 11;4:170-7. 2010 Oct see pages 172 to 173 BLASTOCYST ANALYSIS	
A	WO 2007042044 A1 ( BERNTSEN JOERGEN [DK]) 19 April 2007 (2007-04-19) see pages 26- to 29  -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2013/000506

WO 2007042044 A1	2007-04-19	AT 477499 T	2010-08-15
		CN 101331500 A	2008-12-24
		CN 101495619 A	2009-07-29
		CN 102254150 A	2011-11-23
		CN 103074410 A	2013-05-01
		DE 602007008419 D1	2010-09-23
		DK 2035548 T3	2010-11-22
		EP 1949297 A1	2008-07-30
		EP 2035548 A2	2009-03-18
		EP 2282210 A1	2011-02-09
		ES 2353622 T3	2011-03-03
		JP 2009512037 A	2009-03-19
		JP 2009539387 A	2009-11-19
		JP 2013084277 A	2013-05-09
		JP 2013198503 A	2013-10-03
		US 2008247628 A1	2008-10-09
		US 8265357 B2	2012-09-11
		US 2010041090 A1	2010-02-18
		US 2012309043 A1	2012-12-06
		US 2013102837 A1	2013-04-25
		US 2013225917 A1	2013-08-29
		WO 2007144001 A2	2007-12-21

---

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000506<sup>9</sup>

## A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

G01N 33/483 (2006.01), C12N 5/073 (2010.01), G06T 1/40 (2006.01), A61D 19/00 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

## B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

IPC G01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, MEDLINE, WPI DATA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	Filho ES, Noble JA, Poli M, Griffiths T, Emerson G, Wells D. A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. <b>Hum Reprod.</b> , 27(9):2641-8. 2012 Sep vide páginas 2642 a 2644 - "Methods"	
A	Manna C, Patrizi G, Rahman A, Sallam H. Experimental results on the recognition of embryos in human assisted reproduction. <b>Reprod Biomed Online</b> , 8(4):460-9. 2004 Apr; vide página 460 a 462	
A	A. De Kock, M.P. Smuts, J.D. Madden, A.J. Rodriguez, S.J. Chantilis, M. Meintjes. Digital image analyses of blastocysts. Morphometric correlations with pregnancy outcome. <b>Fertility and Sterility</b> , 86(3):S51 -S52. 07/2006 vide todo o documento	

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

\* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade convencional

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&amp;" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

31/01/2014

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

07/02/2014

Nome e endereço postal da ISA/BR


 INSTITUTO NACIONAL DA  
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar  
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax: +55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Julia Cordeiro Fontanella

Nº de telefone: +55 21 3037-3742/3984

## RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000506

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	Filho ES, Noble JA, Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. <b>Open Biomed Eng J.</b> 11;4:170-7. 2010 Oct vide página 172 a 173 BLASTOCYST ANALYSIS	
A	WO 2007042044 A1 ( BERNTSEN JOERGEN [DK]) 19 abril 2007 (2007-04-19) vide páginas 26 a 29  -----	

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**

Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito-internacional N°

PCT/BR2013/000506

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 2007042044 A1	2007-04-19	AT 477499 T	2010-08-15
		CN 101331500 A	2008-12-24
		CN 101495619 A	2009-07-29
		CN 102254150 A	2011-11-23
		CN 103074410 A	2013-05-01
		DE 602007008419 D1	2010-09-23
		DK 2035548 T3	2010-11-22
		EP 1949297 A1	2008-07-30
		EP 2035548 A2	2009-03-18
		EP 2282210 A1	2011-02-09
		ES 2353622 T3	2011-03-03
		JP 2009512037 A	2009-03-19
		JP 2009539387 A	2009-11-19
		JP 2013084277 A	2013-05-09
		JP 2013198503 A	2013-10-03
		US 2008247628 A1	2008-10-09
		US 8265357 B2	2012-09-11
		US 2010041090 A1	2010-02-18
		US 2012309043 A1	2012-12-06
		US 2013102837 A1	2013-04-25
US 2013225917 A1	2013-08-29		
WO 2007144001 A2	2007-12-21		