

Trabajo Fin de Grado

Grado de Ingeniería Aeroespacial

Diseño e implementación de sistema de microfluídica para manipulación de embriones y ovocitos

Autor: María de los Dolores López Fernández

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

Dep. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016



Trabajo Fin de Grado
Grado de Ingeniería Aeroespacial

**Diseño e implementación de sistema de
microfluídica para manipulación de embriones y
ovocitos**

Autor:

María de los Dolores López Fernández

Tutor:

Ramón de Jesús Risco Delgado

Profesor Titular

Dep. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla
Sevilla, 2016

Trabajo Fin de Grado: Diseño e implementación de sistema de microfluídica para manipulación de embriones y ovocitos

Autor: María de los Dolores López Fernández

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

El tribunal nombrado para juzgar el Trabajo arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2016

El Secretario del Tribunal

Primaveras, veranos, otoños e inviernos, fueron muchas las horas de estudio hasta llegar al día de hoy. Momento en el que pongo punto y a parte a una etapa de mi vida.

Papá, mamá ¡GRACIAS! esa es la palabra que mejor resume en estos momentos mis sentimientos. Gracias por el apoyo, la confianza y el cariño, sobretodo gracias por enseñarme que con ganas, esfuerzo y buena actitud se puede llegar muy lejos.

Gracias a los que ya no estáis, mis angelitos, sé que no dejáis de cuidar de mí.

R.R.S. gracias por tu cariño y comprensión.

Gracias a mi familia porque desde 'a miña terra galega' me brindabais vuestro apoyo.

Gracias a l@s que empezasteis siendo complet@s desconocid@s, luego compañer@s y por último muy buen@s amig@s. Porque a lo largo de estos años hemos compartido risas, lágrimas, confidencias y, sobre todo, ¿Os habéis parado a pensar en la cantidad de bolígrafos que hemos gastado? ;)

Gracias a mis compañer@s de laboratorio por amenizar las horas de ensayos.

Por último, me gustaría agradecerle a mi tutor, Ramón, la oportunidad brindada, el apoyo y la confianza depositada en mí.

Este proyecto surge de la necesidad de desarrollar un sistema de manipulación de embriones y ovocitos.

El objetivo principal es realizar un análisis de los dispositivos empleados en el proceso de vitrificación de dicho material biológico. Se compara el sistema abierto Cryotop frente al sistema cerrado SafeSpeed device, este último ha sido desarrollado por la spin-off de la Universidad de Sevilla Safepreservation.

La motivación de este proyecto es obtener un sistema de aspiración alternativo para facilitar el proceso de carga y descarga del SafeSpeed device. El núcleo de este trabajo se ha desarrollado en el laboratorio por lo que tiene un carácter altamente experimental. Se comprueban, in situ, las ventajas y desventajas de los diferentes sistemas planteados obteniendo finalmente un sistema viable cuyo elemento principal será un bulbo.

Finalmente, se introduce la posibilidad de automatizar dicho sistema de aspiración.

Abstract

This project arises from the need to develop a system of manipulation of embryos and oocytes.

The main target is performing an analysis of the devices used in the process of vitrification of the mentioned biological material. It compares the open system Cryotop to the closed system SafeSpeed device, the latter has been developed by the spin-off from the University of Seville Safepreservation.

The motivation of this project is to obtain an alternative suction system to facilitate the process of loading and unloading of the SafeSpeed device. The core of this work has been developed in the laboratory so it has a highly experimental character. The advantages and disadvantages of the different systems are checked in the field, finally obtaining a viable system whose main element will be a bulb.

Finally, the possibility of automating the suction system is introduced.

Índice de Tablas	XIV
Índice de Figuras	XV
Introducción	XIX
1 Criopreservación de oocitos	1
1.1 <i>Congelación lenta vs vitrificación.</i>	2
1.1.1 Congelación lenta (Slow freezing).	4
1.1.2 Vitrificación.	5
2 Sistemas de almacenamiento de oocitos	6
2.1 <i>SafeSpeed vs Cryotop.</i>	6
2.1.1 Proceso de vitrificación/desvitrificación con uso de Cryotop.	7
2.1.2 Proceso de vitrificación/desvitrificación con uso de SafeSpeed Device.	12
3 Nuevo prototipo de safespeed	22
3.1 <i>Modificaciones de la pajuela principal del SafeSpeed.</i>	22
3.2 <i>Modificaciones en el Protector Cap del SafeSpeed.</i>	25
4 Sistema de aspiración	28
4.1 <i>SafeSpeed: Sistemas de aspiración actuales.</i>	28
4.2 <i>Introducción a la microfluídica del SafeSpeed.</i>	30
4.3 <i>El laboratorio y su entorno.</i>	32
4.3.1 Elaboración de pajuelas para ensayos de laboratorio.	33
4.3.2 Elaboración de la solución de vitrificación para ensayos de laboratorio.	33
4.4 <i>Configuración de los distintos dispositivos ensayados.</i>	39
4.4.1 Experimento 1: Basado en el Émbolo	40
4.4.2 Experimento 2: Basado en el Bulbo	47
5 Sistema de aspiración óptimo	50
5.1 <i>Principio de funcionamiento.</i>	50
5.2 <i>Configuración.</i>	50
6 Desarrollo futuro: Automatización	54
Conclusión	56
Anexo A	57
Anexo B	59
Bibliografía	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de agentes crioprotectores	3
Tabla 3-1: Disposición de colores del nuevo prototipo de SafeSpeed	27
Tabla 4-1: Solución de vitrificación: sustancias y cantidades necesarias para su elaboración.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Dr. Masashige Kuwayama [12].	6
Figura 2-2. Dr. Ramón Risco Delgado [13].	6
Figura 2-3. Protocolo de vitrificación, Cryotop [15].	7
Figura 2-4. Kit de vitrificación, [14].	8
Figura 2-5. Soluciones de vitrificación/desvitrificación, [14].	8
Figura 2-6. Placa petri, [14].	8
Figura 2-7. Placa petri, soluciones, [14].	9
Figura 2-8. Deposición de oocito en placa petri, [14].	9
Figura 2-9. Pajuela Cryotop, [16].	9
Figura 2-10. Pajuela Cryotop, [18].	10
Figura 2-11. Selladora y Contenedor para el baño en Nitrógeno líquido, Cryotop, [16].	11
Figura 2-12. Tasas de supervivencia en grupos celulares, de origen humano, criopreservados con Cryotop [16].	11
Figura 2-13. Protocolo de vitrificación, SafeSpeed [13].	12
Figura 2-14. Protocolo de calentamiento, SafeSpeed [13].	12
Figura 2-15. Soluciones de vitrificación/desvitrificación, [13].	13
Figura 2-16. SafeBox, [13].	13
Figura 2-17. Prototipo de taza para proceso de calentamiento.	14
Figura 2-18. SafeSealer, [13].	15
Figura 2-19. SafeSpeed, [13].	16
Figura 2-20. SafeSpeed (esquema), [13].	16
Figura 2-21. Colored End (SafeSpeed), [13].	17
Figura 2-22. Writing Area (SafeSpeed), [13].	17
Figura 2-23. Colored Segment (SafeSpeed), [13].	18
Figura 2-24. Protector Cap (SafeSpeed), [13]	18
Figura 2-25. Marcas de seguridad en el capilar (SafeSpeed)	19
Figura 2-26. Resultados SafeSpeed, [13].	20
Figura 2-27. Oocitos vitrificados con SafeSpeed vs oocitos frescos, [13].	21
Figura 3-1. Zoom zona Postizo SafeSpeed	22
Figura 3-2. Zoom zona Capilar SafeSpeed	22
Figura 3-3. SafeSpeed Device	23
Figura 3-4. Prototipo SafeSpeed	24

Figura 3-5. Zoom pajuela principal, nueva zona de sellado, SafeSpeed	24
Figura 3-6. Sellado de la pajuela principal, SafeSpeed.	25
Figura 3-7. Protector Cap, SafeSpeed Device	25
Figura 3-8. Evitar tronchamiento del capilar, SafeSpeed Device	26
Figura 3-9. Aumento del Protector Cap, SafeSpeed Device	26
Figura 3-10. Nueva disposición de colores, SafeSpeed Device.	27
Figura 4-1. Sistema de aspiración por boca.	28
Figura 4-2. Sistema de aspiración mediante micromanipulador.	29
Figura 4-3. Parte visible del capilar del SafeSpeed.	30
Figura 4-4. Microscopios y Placa petri.	32
Figura 4-5. Pajuelas para ensayos de sellado.	33
Figura 4-6. DMSO, dimetil sulfóxido.	34
Figura 4-7. Etilenglicol, [19].	35
Figura 4-8. Sacarosa, [19].	35
Figura 4-9. Material necesario para la elaboración de VS.	36
Figura 4-10. Agitador magnético.	37
Figura 4-11. Balanza electrónica.	37
Figura 4-12. Viales para conservar las muestras.	38
Figura 4-13. Sistema de aspiración. Prototipo A.	40
Figura 4-14. Tornillo micrométrico.	42
Figura 4-15. Fijación del tornillo micrométrico, previa a la realización del corte.	42
Figura 4-16. Corte para la adaptación del tornillo micrométrico.	43
Figura 4-17. Pletina metélica para adaptación del imán.	43
Figura 4-18. Sistema de aspiración. Prototipo B.	44
Figura 4-19. Sistema de aspiración. Prototipo C. Bomba de jeringa	46
Figura 4-20. Bulbo o perilla.	47
Figura 4-21. Bulbo como sistema de aspiración. [13]	48
Figura 4-22. Sistema de aspiración. Prototipo D.	48
Figura 5-1. Sistema de aspiración óptimo.	50
Figura 5-2. Conexión <i>Bulbo – Tubo capilar</i> .	51
Figura 5-3. Conexión <i>Tubo capilar – Conector</i> .	51
Figura 5-4. Sistema de aspiración óptimo para la descarga.	53
Figura 5-5. Llave de tres vías.	53

Figura 6-1. Pieza de sujeción del bulbo y anclaje del motor paso a paso.	54
Figura 6-1. Ejemplo de motor paso a paso.	55
Figura Anexo: A-1. Características del tubo capilar	57
Figura Anexo: A-2. Referencia del bulbo.	57
Figura Anexo: A-3. Referencia del conector.	58
Figura Anexo: A-4. Referencia del pegamento.	58
Figura Anexo: B-1. Secuencia 1.	59
Figura Anexo: B-2. Secuencia 2.	59
Figura Anexo: B-3. Secuencia 3.	60
Figura Anexo: B-4. Secuencia 4.	60
Figura Anexo: B-5. Secuencia 5.	60
Figura Anexo: B-6. Secuencia 6.	61
Figura Anexo: B-7. Secuencia 7.	61
Figura Anexo: B-8. Secuencia 8.	61
Figura Anexo: B-9. Secuencia 9.	62
Figura Anexo: B-10. Secuencia 10.	62
Figura Anexo: B-11. Secuencia 11.	62
Figura Anexo: B-11. Secuencia 11.	63
Figura Anexo: B-13. Secuencia 13.	63
Figura Anexo: B-14. Secuencia 14.	63
Figura Anexo: B-15. Secuencia 15.	64
Figura Anexo: B-16. Secuencia 16.	64
Figura Anexo: B-17. Secuencia 17.	64
Figura Anexo: B-18. Secuencia 18.	65
Figura Anexo: B-19. Secuencia 19.	65
Figura Anexo: B-20. Secuencia 17.	65

Introducción

La historia demuestra que desde la Antigüedad el hombre ha tenido la necesidad de dar solución a los problemas prácticos que le iban surgiendo. Inventos como la rueda, la máquina de vapor o los vehículos espaciales han permitido la supervivencia y evolución del ser humano. Cuando se estudia un Grado de Ingeniería se adquieren conocimientos que abarcan distintas disciplinas tales como física, matemáticas, electrónica o mecánica de fluidos. Es por ello, que todo ingeniero hace uso de su formación académica para plasmar dichos conocimientos en soluciones pragmáticas que se ajusten a las necesidades y limitaciones del proyecto bajo estudio.

La ingeniería sirve para dar respuesta a problemas de carácter aeronáutico, civil o industrial pero también es necesaria en otros ámbitos de estudio diferentes como puede ser la biomedicina. Este es el caso del presente proyecto pues el problema al cual se le quiere dar solución está inmerso en dicho campo de estudio. Esto hace que sea necesario, por parte del ingeniero, adquirir conocimientos ajenos a su especialidad.

La raíz de este proyecto no es otra que el deseo de ser padres y tener la necesidad, por el motivo que sea, de recurrir a la reproducción asistida para lograrlo. Para poder llevar a cabo dicho proceso es necesario, a su vez, recurrir a la criopreservación de células sexuales, óvulos y espermatozoides. Biólogos y embriólogos serán los encargados de analizar y optimizar los protocolos de criopreservación de dichas células mientras que los sistemas para poder realizar el proceso son desarrollados en el ámbito ingenieril. Para realizar este trabajo de fin de grado se parte de la base de que ya se dispone de un sistema cerrado para criopreservar óvulos, el SafeSpeed device, así como de varios sistemas que permiten la carga y descarga del mismo. No obstante, el reto al que nos enfrentamos es el de inventar un sistema de carga y descarga alternativo que ofrezca mejores prestaciones que los actuales. Este hecho, dará lugar a la realización de varios ensayos con diferentes métodos, la mayoría de los cuales se irán descartando por diferentes motivos; cerrando así un círculo de investigación hasta alcanzar un sistema que sea viable en clínicas de reproducción asistida.

Dentro de la Mecánica de los Medios Continuos aquella rama de la Física que estudia el movimiento de los fluidos y las fuerzas que lo provocan es la Mecánica de Fluidos. En este proyecto será necesario analizar el comportamiento de un líquido y un gas en el interior de tubos, microtubos y capilares, así como el movimiento de la interfase aire-líquido. Por todo ello esta disciplina tendrá un papel fundamental en el desarrollo del mismo.

El contenido de este documento seguirá una estructura deductiva. En primer lugar, será necesario contextualizar el proyecto, para ello se describirá el proceso de criopreservación de óvulos y se describirán los sistemas, abierto y cerrado, empleados en la actualidad. A continuación, se centrará el trabajo en el sistema cerrado SafeSpeed device, en concreto, se describirán los sistemas de aspiración actuales y se plasmarán las ideas de nuevos sistemas, profundizando en aquellos que ofrecieron mejores resultados. Finalmente, se introduce la posibilidad de automatizar dicho sistema.

1 CRIOPRESERVACIÓN DE OOCITOS

La Biología es la ciencia que se encarga del estudio de los seres vivos. Es una ciencia muy amplia y abarca numerosas ramas de conocimiento: Anatomía, Etología y Ecología, son algunas de ellas. No obstante, será la Criobiología la que despierte mayor interés en el desarrollo de este proyecto.

El estudio del comportamiento que experimentan las células, tejidos, órganos u organismos completos cuando son sometidos a la exposición, por un cierto periodo de tiempo, de temperaturas más bajas de las normales es competencia de la Criobiología. Dichas temperaturas pueden abarcar desde temperaturas hipotérmicas hasta temperaturas criogénicas.

En el siglo XVIII, Lázaro Spallanzani conocido como “Biólogo de Biólogos” realizó un proceso de congelación y descongelación de una muestra de semen, este hecho supuso la primera criopreservación de gametos humanos de la que se encuentran datos. A lo largo del XX los avances en esta materia fueron bastante notables, pues el objetivo principal era criopreservar óvulos y espermatozoides mediante el desarrollo de protocolos de enfriamiento que propiciaran buenos resultados. En 1953, gracias Bunge y Sherman, se pudo llevar a cabo la primera inseminación artificial exitosa a partir esperma humano, glicerado y congelado a -70°C , temperatura de solidificación del gas carbónico.

A principios del siglo XXI, más de 625.000 mujeres estadounidenses padecieron cáncer; alrededor del 8% tenían menos de 40 años por lo que estaban en un rango de edad viable para poder gestar. Sin embargo, por desgracia, los tratamientos actuales contra el cáncer generan en las pacientes disfunción ovárica, anovulación o en situaciones más severas infertilidad. Por ello, gracias a las técnicas de criopreservación las mujeres que sufren cáncer tienen la posibilidad de extraer y conservar sus óvulos antes de someterse a las sesiones de quimioterapia o radioterapia que permiten combatir dicha enfermedad, manteniendo así la posibilidad de, una vez ganada esa batalla, ser madres.

Originalmente, la base de la preservación de embriones humanos radicaba en las técnicas de criopreservación ensayadas con roedores. Los embriones se sometían a un proceso de enfriamiento lento alcanzando temperaturas de -100°C , sumergiéndolos entonces en nitrógeno líquido¹. Años después se observó que, si los embriones se descongelaban rápidamente, a una velocidad de enfriamiento determinada, entonces el proceso de enfriamiento lento debía interrumpirse entorno a -30°C o -40°C . Frente a este proceso de enfriamiento lento y en el ámbito de la reproducción asistida en humanos surge, más recientemente, un nuevo concepto: el proceso de vitrificación.

¹ Nitrógeno líquido, (N_2): es un gas licuado, incoloro, inodoro y no combustible. Se emplea en las tecnologías y biotecnologías reproductivas con la finalidad de conservar tejidos, esperma, oocitos o cualquier otro tipo de material biológico. Para poder manipular este gas sin cometer ninguna imprudencia es necesario conocer sus propiedades y tomar ciertas medidas de seguridad.

- No es un gas tóxico, pero puede provocar asfixia si el oxígeno del aire es reemplazado por él.
- Puede ocasionar congelación a través del contacto, generando lesiones en los tejidos similares a las producidas por una quemadura.
- Se corre el riesgo de explosión por evaporación. El N_2 líquido tiende a evaporarse por ello, para evitar dicho riesgo de explosión es necesario que el recipiente o cántara que lo contenga disponga de una salida de gases.

1.1 Congelación lenta vs vitrificación.

Hoy en día, son dos las técnicas que destacan en el proceso de criopreservación de oocitos: la congelación lenta y la vitrificación. El proceso de criopreservación consiste en mantener los oocitos congelados de tal forma que sea factible preservar su viabilidad en el tiempo. Esto es posible debido a que al congelar una célula se induce en ella un parón biológico, es decir, durante el periodo de tiempo en el cual permanece congelada no se produce ningún cambio de sus reacciones biológicas o bioquímicas. No obstante, el proceso de congelación de óvulos no es ni mucho menos una trivialidad pues es necesario tener en cuenta una serie de factores que no resultan beneficiosos en dicho proceso. A continuación, se destacan algunos de los puntos más relevantes:

- Durante el proceso de enfriamiento existe una franja bastante crítica comprendida entre los 15°C y los -5°C a partir de la cual puede tener lugar el daño celular. Tanto los lípidos² de la membrana como los microtubos del huso meiótico³ pueden sufrir daños de carácter irreversible.
- Desde los -5°C a los -80°C se corre el riesgo de que se formen pequeños cristales de hielo que pueden dañar la estructura de la membrana celular.
- Entre los -5°C y los -150°C puede tener lugar un proceso de solidificación del medio, originando el daño celular tal que la zona pelúcida⁴ es la que se verá más afectada.
- La membrana celular también se puede ver afectada por el aumento de la concentración de solutos, consecuencia de la deshidratación celular.

Estos efectos nocivos para la conservación celular se pueden combatir mediante el uso de crioprotectores y, por supuesto, controlando la temperatura en los protocolos de criopreservación.

❖ AGENTES CRIOPROTECTORES

Por los motivos expuestos anteriormente es necesario que los embriones, durante los procesos de enfriamiento y calentamiento, se encuentren suspendidos en soluciones compuestas por solutos crioprotectores. Estas soluciones tienen que cumplir una serie de características:

- Al enfriarse, deben vitrificar a una tasa repetible.
- Al calentarse, deben permanecer vítreas.
- Durante el periodo en el cual el embrión se encuentra expuesto a ellas, no deben ser

² Lípidos: conjunto de moléculas orgánicas constituidas principalmente por Carbono, Hidrógeno y un pequeño porcentaje de Oxígeno. Son insolubles en agua y su función dentro de los organismos puede ser de reserva energética, de soporte estructural o tener una función reguladora.

³ Huso meiótico: también denominado Huso acromático es un conjunto de microtúbulos que brotan de los centriolos durante el proceso de división celular.

⁴ Zona pelúcida: capa externa que rodea los oocitos y cuya finalidad es dar protección y soporte alimenticio al oocito en la fase prematura de desarrollo.

tóxicas.

Los embriones se caracterizan porque son más permeables al agua que a los crioprotectores por ello, cuando están bajo la acción de un agente crioprotector, en primer lugar, tienden a contraerse. Esta disminución de tamaño es debida a la deshidratación por la hiperosmolaridad de la solución extracelular. Para que la criopreservación de gametos sea efectiva es necesario aplicar concentraciones de crioprotectores bastante elevadas, pero esto puede provocar toxicidad, bioquímica o por estrés osmótico, en las células. Por ello la selección de los crioprotectores jugará un papel importante en el proceso de criopreservación de oocitos u otras células.

En la siguiente tabla se muestran algunos ejemplos de crioprotectores. Se puede observar como se distribuyen en tres grandes grupos atendiendo a las propiedades de permeabilidad y peso molecular.

Permeables & Bajo peso molecular	No permeables & Bajo peso molecular	No permeables & Alto peso molecular
Metanol	Glucosa	Polivinilpirrolidona
Etilenglicol	Sacarosa	Alcohol polivinílico
Dimetilsulfóxido	Galactosa	Hialuronidato de sodio
Otros alcoholes	Otros azúcares	Otros polímeros

Tabla 1-1: Clasificación de agentes crioprotectores

Se tienen por tanto agentes permeables que penetrarán en la célula y agentes no permeables que actuarán en el exterior de la misma. Ambos tienen como finalidad propiciar la deshidratación de la célula, no obstante, los crioprotectores penetrantes asumirán la responsabilidad de evitar la formación de cristales en el interior de la misma e impedirán que tenga lugar el fenómeno de estrés osmótico. La concentración de crioprotector está ligada a la efectividad del proceso de vitrificación, concentraciones elevadas propician buenos resultados, pero como ya se ha mencionado pueden provocar la toxicidad de la célula. Por ello, el reto radica en combinar diferentes tipos de crioprotectores en pequeñas cantidades reduciendo así los efectos nocivos que pudiesen aparecer debido a las altas concentraciones.

Los crioprotectores serán necesarios tanto en el método tradicional o de equilibrio denominado Slow freezing, como en el método de vitrificación; siendo este último un método de no equilibrio cuyo uso, a día de hoy, solapa el método tradicional. En los siguientes subapartados se describirán brevemente ambos procesos de criopreservación. No obstante, es necesario destacar que el proceso de vitrificación, a día de hoy, ofrece mejores resultados que el método tradicional. La diferencia fundamental estriba en que, como se verá en más detalle a continuación, en el método tradicional se

va regulando la velocidad de enfriamiento durante un periodo de tiempo determinado, de ahí que se conozca como congelación lenta, mientras que en la vitrificación podría decirse que el enfriamiento se lleva a cabo de forma casi instantánea. Por ello, con esta segunda técnica es posible reducir o llegar a eliminar la formación de cristales de hielo dentro y fuera de la célula. Esto tiene como consecuencia que las tasas de supervivencia con el método de vitrificación sean superiores a las obtenidas con la técnica de criopreservación tradicional.

1.1.1 Congelación lenta (Slow freezing).

Este protocolo se caracteriza porque al someter a la célula a una variación lenta de temperatura esta es capaz de responder osmóticamente originando la deshidratación de la misma. Para poder llevar a cabo este procedimiento es necesario que el descenso de temperatura se lleva a cabo de manera programada, donde la variable sobre la cual se ejercerá el control será la velocidad de enfriamiento o calentamiento.

El protocolo original de criopreservación se caracterizaba porque la velocidad de enfriamiento oscilaba entre $0.3 - 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, los embriones se enfriaban hasta temperaturas lo suficientemente bajas entre -80°C y -120°C . Fue entre 1977 y 1978 cuando Willadsen propuso una variante a dicho procedimiento, consistía en mantener la velocidad de enfriamiento constante a $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mientras los embriones, de origen bovino, se enfriaban hasta -35°C antes de introducirlos en nitrógeno líquido.

Hasta hace relativamente pocos años, el slow freezing era el método que se empleaba en las clínicas de reproducción asistida para criopreservar los oocitos. A continuación, se describe sucintamente uno de los protocolos de enfriamiento/calentamiento para reproducir dicho método:

En primer lugar, es necesario destacar que para llevar a cabo este proceso se necesitan pajuelas que se puedan sellar herméticamente y un congelador programable.

❖ CONGELACIÓN DE OVOCITOS

- Manteniendo una velocidad de enfriamiento constante de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ se disminuye la temperatura hasta -7°C . Una vez alcanzada dicha temperatura se realiza la inducción manual de seeding⁵ y se mantienen los oocitos a temperatura constante durante 10min .
- El siguiente paso consiste en disminuir la temperatura, a una velocidad de enfriamiento de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta los 33 grados bajo cero.
- Por último, cuando se hayan alcanzado los -33°C , se sumergen las pajuelas en nitrógeno líquido.

⁵ Inducción manual del seeding: consiste en la formación de hielo extracelular; se realiza tocando las paredes del recipiente que contiene el ovocito, bañado en crioprotectores, con una especie de varilla metálica que se encuentra a la temperatura propia del nitrógeno líquido, -196°C . Esta fase es crítica pues inicia el proceso de deshidratación de los ovocitos.

❖ DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS

- El primer paso consiste en extraer las pajuelas del Nitrógeno líquido y dejarlas durante 40s a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se dejan durante 1min a baño maría (31°C).
- Entonces, se lleva a cabo un proceso de rehidratación de los ovocitos y eliminación de los agentes crioprotectores con el objetivo de que los oocitos recuperen su estructura normal.
- Finalmente, antes de que se microinyecten es necesario que permanezcan en una incubadora a 31°C.

1.1.2 Vitricación.

Frente a la técnica de Slow freezing descrita en el apartado anterior, el proceso de vitricación es más novedoso y ofrece mejores resultados. La vitricación se caracteriza principalmente por la aplicación de velocidades ultrarrápidas de enfriamiento. Esto se consigue con la reducción de medio de vitricación que, por otra parte, también permite reducir la concentración de crioprotectores y por consiguiente se reduce el peligro de toxicidad en la célula.

El proceso de vitricación cuenta con una serie de pasos que se recogen en los siguientes puntos:

- En primer lugar, es necesario deshidratar los óvulos. Para ello se van sumergiendo los óvulos en distintas soluciones de equilibrio de forma que la concentración de crioprotectores vaya en aumento.
- En segundo lugar, una vez que el oocito se encuentre en el medio de vitricación es necesario depositarlo en el sistema de vitricación ya sea un Cryotop o el SafeSpeed. Es importante que la cantidad de medio de vitricación que acompaña al óvulo sea mínima.
- Por último, se induce el enfriamiento ultrarrápido. Esto se consigue sumergiendo el dispositivo que contiene el oocito en el recipiente que aloja el Nitrógeno líquido a -196°C .

Una vez que los óvulos son congelados, en algún momento, será necesario descongelarlos. Este proceso de desvitricación se caracteriza porque, al igual que en el método tradicional es necesario volver a hidratar el óvulo. Para ello, se sumerge la pajuela en soluciones de desvitricación con el objetivo de eliminar los crioprotectores. Finalmente, antes de microinyectar el óvulo es necesario someterlo a un proceso de incubación, tal y como ocurría en el proceso de Slow freezing.

2 SISTEMAS DE ALMACENAMIENTO DE OOCITOS

2.1 SafeSpeed vs Cryotop.

El proceso de vitrificación de gametos humanos requiere del empleo de un sistema de almacenamiento de los oocitos. Es decir, para poder sumergir las células en el contenedor de Nitrógeno líquido y llevar a cabo el proceso de enfriamiento ultrarrápido es necesario que, previamente, las células sexuales hayan sido depositadas en un recipiente determinado. Dicho recipiente de almacenamiento es conocido popularmente como pajuela y esta puede ser de dos tipos: el Cryotop, cuyo uso está más extendido por ser el método pionero de vitrificación, o el SafeSpeed que poco a poco se va abriendo camino en las clínicas de reproducción asistida. No obstante, es necesario destacar que el proceso de vitrificación es relativamente moderno y se encuentra en auge en la actualidad. Pues, dado que ofrece mejores resultados que el método tradicional de Slow freezing, son muchos los científicos e ingenieros que tratan de mejorar los protocolos relativos a esta técnica de criopreservación y, a colación, también se busca mejorar los sistemas empleados para llevar a cabo el proceso.

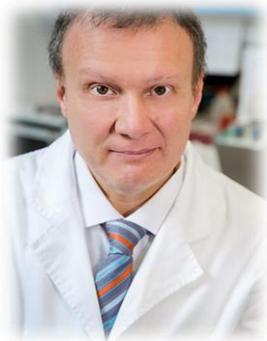


El Dr. Masashige Kuwayama, nació el 15 de Enero de 1962 en Osaka. Su interés por la biología surgió a raíz del regalo que le hizo su padre al cumplir los 10 años, un microscopio.

A partir de 1983, emprendió su carrera en el ámbito científico, en concreto, sus investigaciones se encauzaron en la rama de la embriología. Por consiguiente, los avances en las técnicas de criopreservación y Fecundación In Vitro marcaron su futuro profesional.

Figura 2-1. Dr. Masashige Kuwayama [12].

Fue a finales del siglo XX cuando presentó su nuevo método de vitrificación, conocido mundialmente como Cryotop, también fue el impulsor y creador del primer banco de oocitos humanos denominado 'Future Mother'.



El Dr. Ramón Risco Delgado, nacido en Sevilla en 1966, se doctoró en Física en el 1997. Los primeros años de su vida como investigador se ciñeron a la Física nuclear y, especialmente, a la Mecánica Cuántica.

En el año 2002, su línea de investigación dió un giro transcendental, centrando sus estudios en la biotecnología.

Figura 2-2. Dr. Ramón Risco Delgado [13].

En concreto, la criopreservación de material biológico constituiría uno de los núcleos de sus investigaciones. Fue en el año 2007, cuando consigue criopreservar ciertos tipos de células, esencialmente oocitos, mediante el desarrollo de un nuevo sistema de vitrificación, el SafeSpeed.

2.1.1 Proceso de vitrificación/desvitricación con uso de Cryotop.

El método de vitrificación Cryotop consta de dos fases: la vitrificación, cuya duración aproximada es de 16min, y el proceso de calentamiento o descongelación para el cual son necesarios 10min. En la siguiente imagen y a nivel de esquema se muestran ambos protocolos:

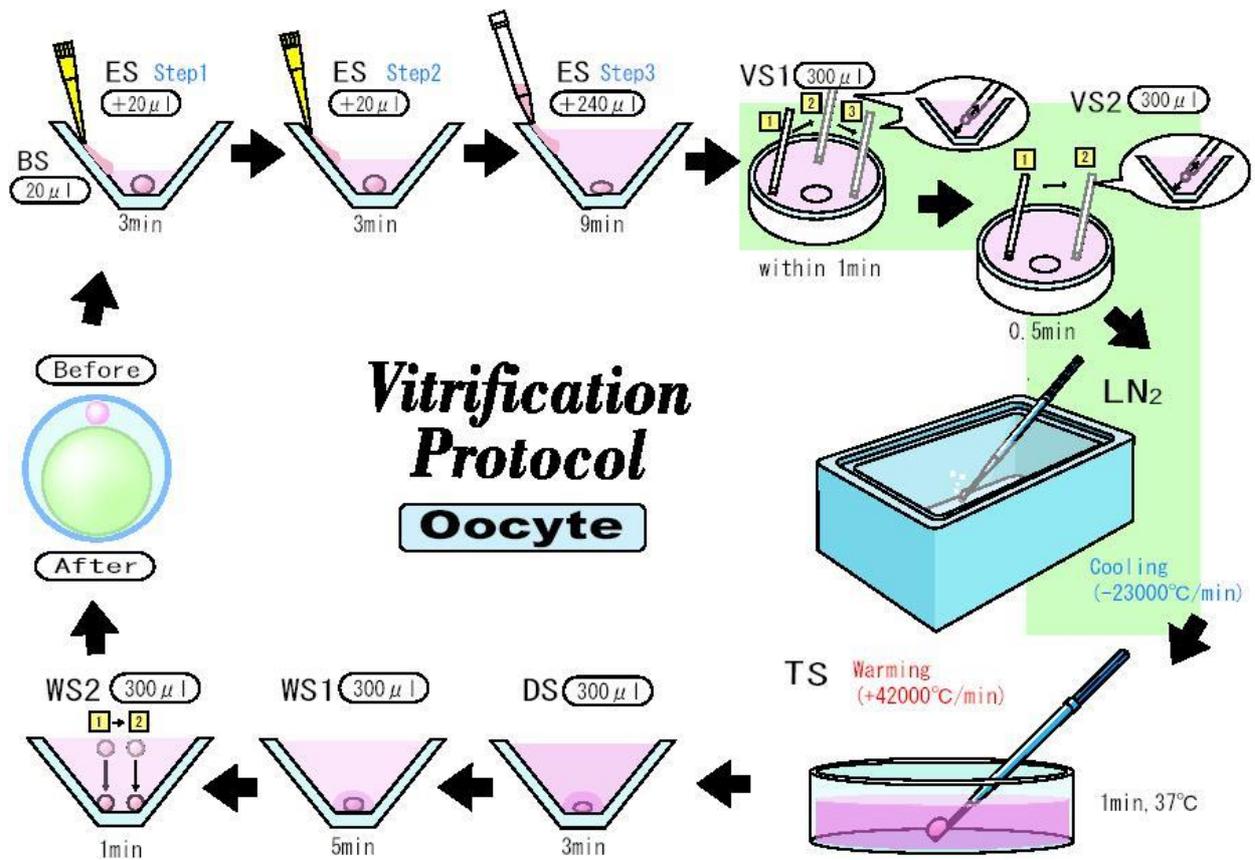


Figura 2-3. Protocolo de vitrificación, Cryotop [15].

Los útiles y productos imprescindibles para llevar a cabo el proceso se describen a continuación:



Figura 2-4. Kit de vitrificación, [14].

- **Soluciones de vitrificación/desvitrificación:** son vitales en el proceso de criopreservación ya que asociadas a ellas está la posibilidad de mantener las células al margen de cualquier efecto nocivo que provoque el proceso: evitar la formación de cristales intra o extracelulares es un ejemplo de ello.



Figura 2-5. Soluciones de vitrificación/desvitrificación, [14].

- **Placas petri:** Durante la vitrificación o desvitrificación es necesario, como ya se hizo referencia con anterioridad, suspender los óvulos en distintas soluciones las cuales, se depositan previamente, sobre sendas placas petri confeccionadas para dicho uso.



Figura 2-6. Placa petri, [14].



Figura 2-7. Placa petri, soluciones, [14].

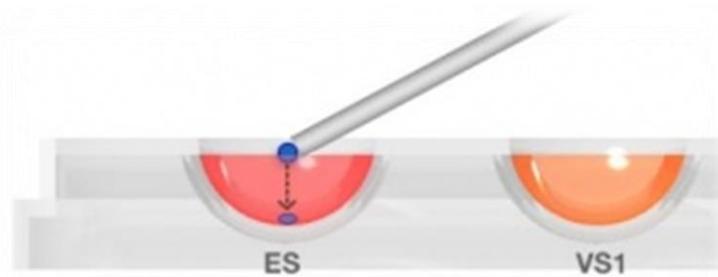


Figura 2-8. Deposición de oocito en placa petri, [14].

- Pajuela Cryotop:** es uno de los principales elementos en el proceso de vitrificación y posterior almacenamiento de las células. A continuación, se describe este sistema con mayor precisión, pues supone la diferencia fundamental respecto a la vitrificación con el SafeSpeed. No obstante, es menester destacar en este punto que existe una variante del Cryotop denominada Cryotec. Sin embargo, en el presente trabajo, no se hará una distinción exhaustiva entre ambas, pues la pajuela sobre la que recae el interés del mismo es el SafeSpeed Device. Por ello, tal y como se ha venido haciendo hasta el momento la terminología que se empleará será, en todo momento, Cryotop.



Figura 2-9. Pajuela Cryotop, [16].

❖ SISTEMA DE ALMACENAMIENTO CRYOTOP

El cryotop supuso un antes y un después en el ámbito de la criobiología. Este novedoso sistema permitía llevar a cabo procesos de vitrificación exitosos, pues erradicaba en gran medida los daños acaecidos por la formación de cristales en las células. Debido a ello, su uso se ha ido expandiendo a nivel mundial siendo, a día de hoy y globalmente hablando, el método más empleado en clínicas de reproducción asistida.

Este sistema de almacenamiento se caracteriza por ser simple y fácil de usar. Tal y como se aprecia en la imagen inferior, el Cryotop consta de una lengüeta de polipropileno sobre la cuál se depositan los oocitos. La marca negra indica la posición a partir de la cual debe posicionarse el óvulo. Para facilitar el manejo de la pajuela está dispone de un mango de plástico. Además, para proteger los ovocitos durante el periodo de almacenamiento la pajuela dispone de una carcasa de plástico transparente.



Figura 2-10. Pajuela Cryotop, [18].

Se define como un sistema semi abierto pues las células sexuales, oocitos, se depositan sobre la lengüeta y, a continuación, esta se introduce en la carcasa protectora; la cual, ya está previamente sumergida en el contenedor de Nitrógeno líquido. Es en ese momento cuando se lleva a cabo el proceso de sellado del extremo de la carcasa; La selladora que se emplea en el proceso, así como el contenedor de Nitrógeno líquido se pueden observar en la siguiente imagen:



Figura 2-11. Selladora y Contenedor para el baño en Nitrógeno líquido, Cryotop, [16].

Finalmente, en la siguiente imagen se muestran las tasas de supervivencia de diferentes grupos celulares sometidos al proceso vitrificación y desvitrificación mediante Cryotop:

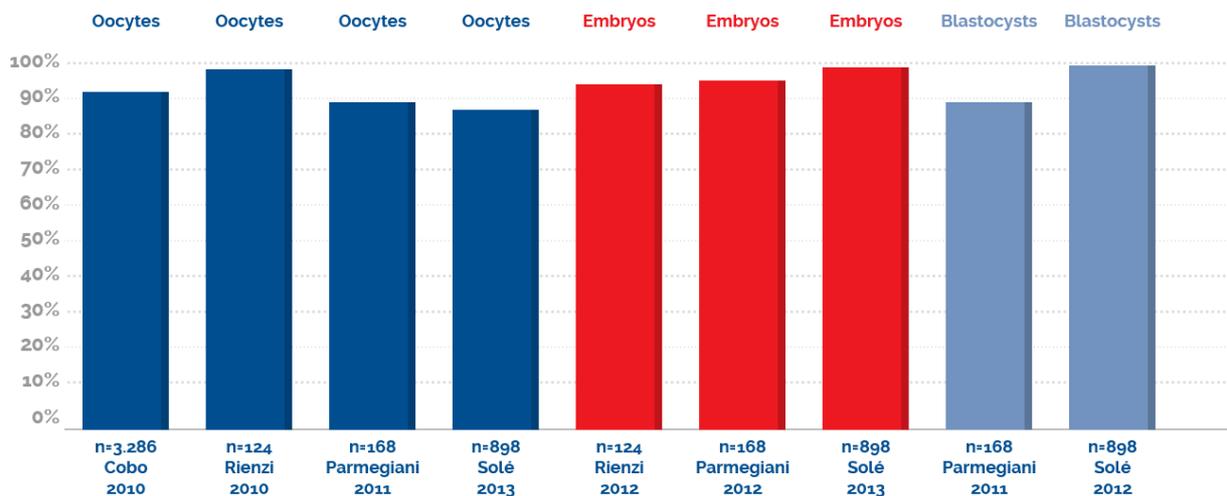


Figura 2-12. Tasas de supervivencia en grupos celulares, de origen humano, criopreservados con Cryotop [16].

Se observa que, en los tres grupos celulares estudiados: oocitos, embriones y blastocitos; la tasa de supervivencia es superior al 80%.

2.1.2 Proceso de vitrificación/desvitrificación con uso de SafeSpeed Device.

SafeSpeed es una técnica de criopreservación alternativa al Cryotop que, al igual que este, permite someter los ovocitos, embriones y blastocitos a procesos de enfriamiento y calentamiento ultrarrápidos. Se caracteriza principalmente por ser un método sencillo, seguro y eficiente. Además, la rapidez en la realización del proceso es otra de sus características a destacar.

Los procesos de vitrificación/desvitrificación se muestran, a continuación, en sendos esquemas:

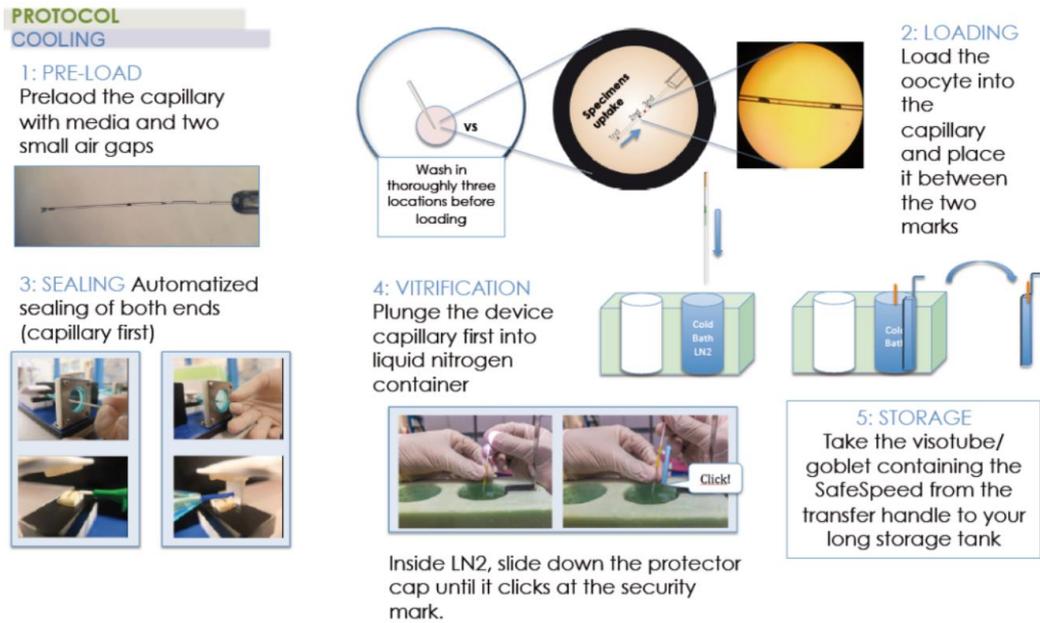


Figura 2-13. Protocolo de vitrificación, SafeSpeed [13].

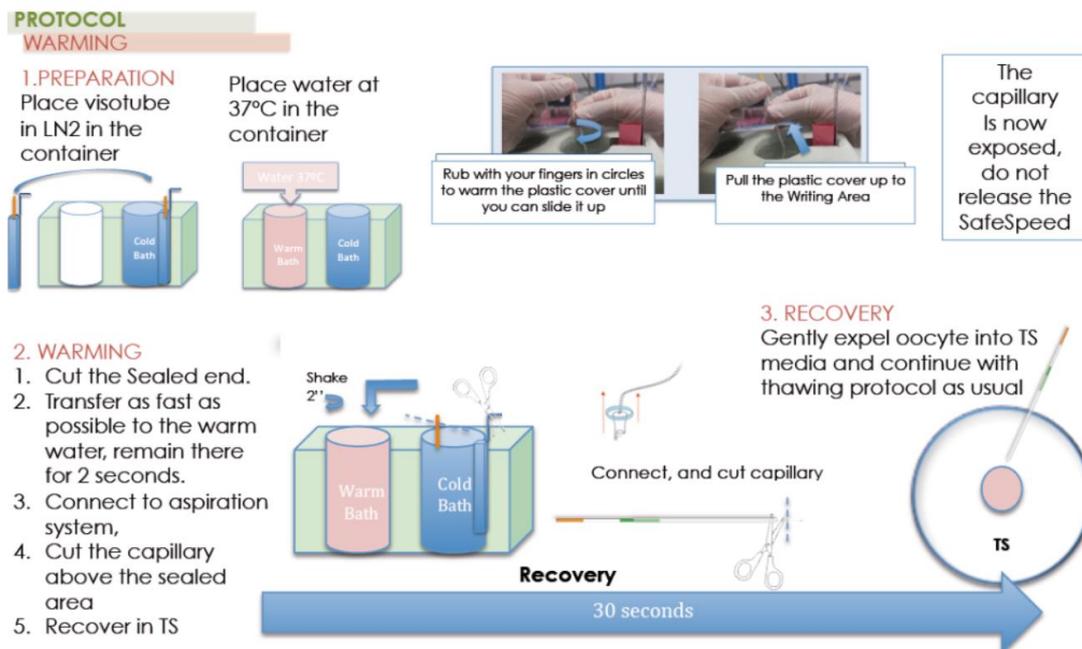


Figura 2-14. Protocolo de calentamiento, SafeSpeed [13].

Para llevar a cabo los procesos arriba descritos son necesarios una serie de elementos análogos a los empleados en el método Cryotop. Por ello, será el SafeSpeed Device el que marcará la principal diferencia. De ahí, que ambos métodos deban su nombre al sistema encargado de almacenar los oocitos o célula en cuestión en el proceso de criopreservación.

- **Medios de vitrificación/desvitrificación:** cada protocolo, ya sea el de enfriamiento o el de calentamiento requiere de tres soluciones. En el proceso de vitrificación se emplea un medio base, otro de equilibrio y el propio de vitrificación; por su parte, durante el calentamiento serán las soluciones de calentamiento, disolvente y la de lavado las que marquen el proceso. La función de estos medios, ya mencionada en el método Cryotop, es proteger a la célula evitando la formación de cristales o cualquier otro efecto nocivo para la misma.



Figura 2-15. Soluciones de vitrificación/desvitrificación, [13].

- **SafeBox:** este dispositivo cuenta con dos oquedades que, durante el proceso de calentamiento, contendrán Nitrógeno líquido y agua a 37°C. La carcasa es de acero inoxidable mientras que el interior está construido a partir de un material que se emplea en la industria aeroespacial, Polietileno de grado 5.



Figura 2-16. SafeBox, [13].

Por otra parte, en el proceso de vitrificación, la pajuela sólo es necesario introducirla en la oquedad de Nitrógeno líquido sin necesidad de tener que pasar por un baño maría. Por ello se optó por diseñar un contenedor similar al del método Cryotop que, para el proceso de calentamiento, iría acompañado de un contenedor de menor dimensión al que se denominará taza. Ambos dispositivos están en constante reconstrucción para poder optimizar sus dimensiones lo máximo posible y facilitar así el futuro trabajo en los laboratorios de reproducción asistida.

En la siguiente imagen se puede observar un prototipo de la taza que acompaña al contenedor de Nitrógeno líquido citado con anterioridad. Este prototipo fue desarrollado en el laboratorio durante la realización de este proyecto. Para su elaboración se empleó un programa de diseño CAD y una impresora bq 3D.

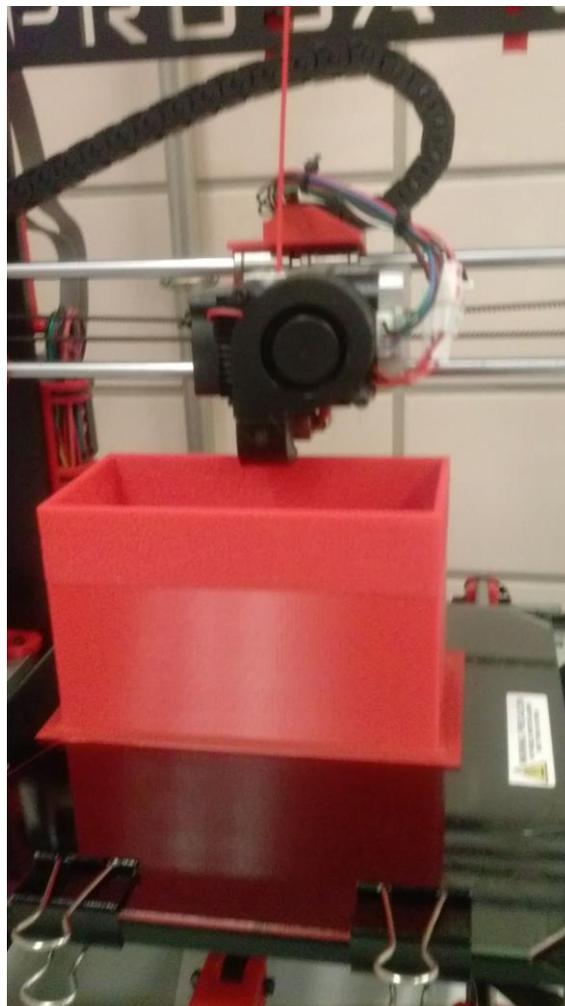


Figura 2-17. Prototipo de taza para proceso de calentamiento.

- **SafeSealer:** como se explicará a posteriori, para llevar a cabo el proceso de criopreservación de oocitos correctamente es necesario sellar el SafeSpeed device. Este dispositivo cuenta con dos selladoras manuales que permiten llevar a cabo dicho proceso. Tiene dos orificios de entrada, uno para el sellado del capilar y el otro para el

sellado del postizo, pues al tratarse de materiales diferentes tanto la temperatura como el tiempo de sellado son distintos.

El proceso de sellado es muy simple, basta con introducir el capilar o el postizo en la selladora correspondiente y con el dedo pulgar presionar la selladora. Esta cuenta con un led que se enciende en el momento en que se ejerce la presión y, una vez finalizado el proceso, este se apaga y ya se puede retirar el SafeSpeed. En caso de que el led no se encienda es un aviso de que no se está ejecutando el proceso correctamente, probablemente será necesario ejercer más presión.

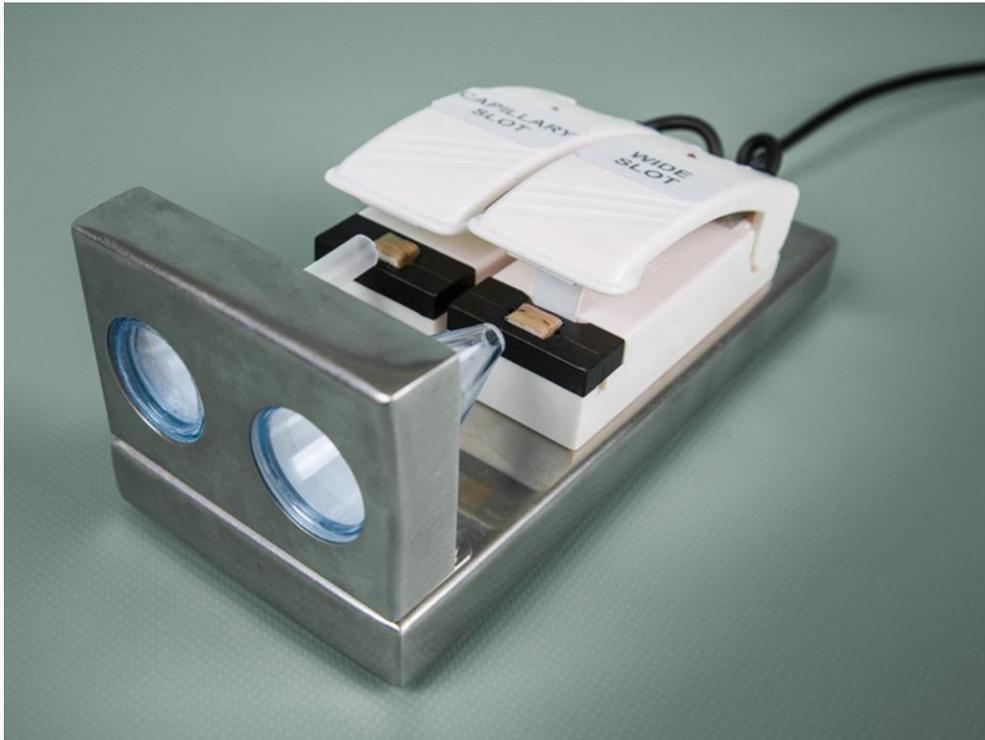


Figura 2-18. SafeSealer, [13].

A pesar de tratarse de un procedimiento sencillo y eficaz, la tendencia actual a la automatización es primordial. Por ello, a lo largo de este curso se ha ido desarrollando un prototipo alternativo de selladora. Se busca aumentar la sencillez manteniendo la eficiencia.

En la SafeSealer automática se mantiene la filosofía de diferenciar el sellado del capilar del sellado del postizo, es decir, consta de dos selladoras donde cada tendrá implementado el código de sellado indicando la temperatura y tiempo correspondientes al sellado de una de las partes del SafeSpeed. Esta selladora, a diferencia de la manual, cuenta con una pantalla en la que irán apareciendo las indicaciones a seguir en el proceso de sellado; facilitando así la labor del embriólogo. El sellado es automático gracias a que dispone de dispositivos tales como fotorresistencias o switches capaces de detectar la posición del capilar o del postizo e iniciar automáticamente el sellado de los mismos. Es importante tener en cuenta que en el proceso de sellado primero se sella el capilar y posteriormente el postizo por ello, la SafeSealer automática se encuentra implementada para que se siga ese procedimiento y ninguno otro alternativo. Este prototipo de selladora alberga grandes expectativas y posiblemente en muy poco tiempo sustituya a las SafeSealer actuales.

- **Pajuela SafeSpeed:** dispositivo encargado de almacenar los oocitos durante el proceso de criopreservación.

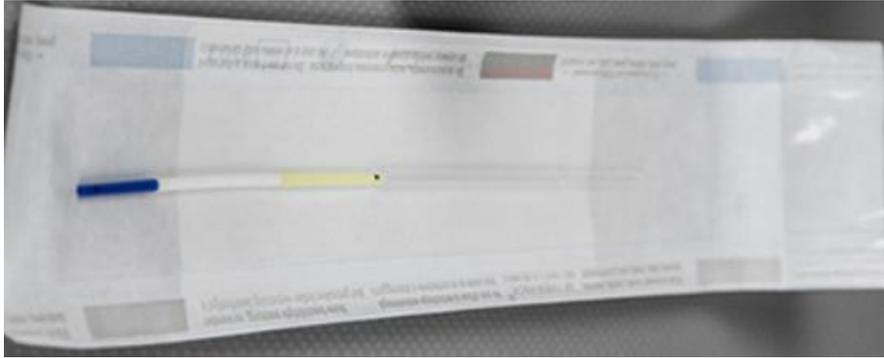


Figura 2-19. SafeSpeed, [13].

- **Sistema de aspiración:** facilita la introducción del oocito en el SafeSpeed Device, el posicionamiento del mismo en la zona de almacenamiento y la posterior expulsión.

❖ SISTEMA DE ALMACENAMIENTO SAFESPEED

El SafeSpeed device es un sistema de almacenamiento completamente cerrado cuya base radica en la optimización del proceso de calentamiento. Gracias al empleo de las selladoras mencionadas con anterioridad el SafeSpeed queda herméticamente cerrado antes de entrar en contacto con el Nitrógeno líquido, evitando así cualquier riesgo de contaminación.

La velocidad de calentamiento que requiere este dispositivo para el empleo de soluciones de vitrificación de oocitos humanos es de $200.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mientras que con una solución estándar es de $600.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

El dispositivo SafeSpeed está constituido por diversas partes claramente diferenciadas; en la siguiente imagen se muestra un esquema del mismo:

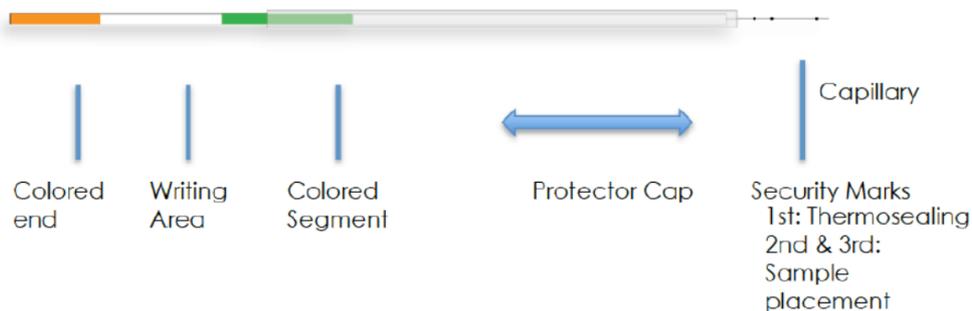


Figura 2-20. SafeSpeed (esquema), [13].

- **Colored End (E):** esta zona, también denominada pajuela francesa o postizo, se corresponde con el extremo del SafeSpeed. Tiene dos misiones importantes; por una parte, sirve de punto de anclaje al sistema de aspiración que se desee usar y por otra es el área en la cual se ejecuta el sellado posterior del SafeSpeed.



Figura 2-21. Colored End (SafeSpeed), [13].

- **Writing Area (G):** conocida como zona de escritura es la parte del SafeSpeed destinada a la identificación del material biológico que se introduce y almacena en el dispositivo. Así como el resto de elementos son de sección circular, este segmento tiene sección cuadrada para facilitar la escritura en el mismo y, por ello, siempre será de color blanco.

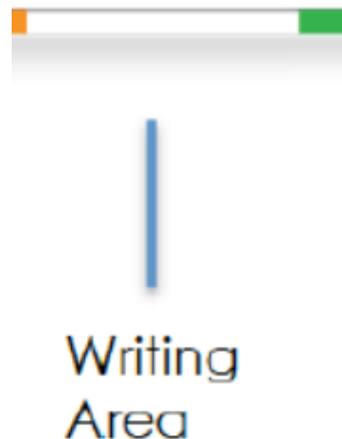


Figura 2-22. Writing Area (SafeSpeed), [13].

- **Colored Segment (B2):** Forma parte de la carcasa de la pajuela principal y su función es dar protección a la misma. Cuando el capilar está sin protección esta zona está completamente cubierta por el Protector Cap, por lo que también es un indicador del nivel de protección del capilar.

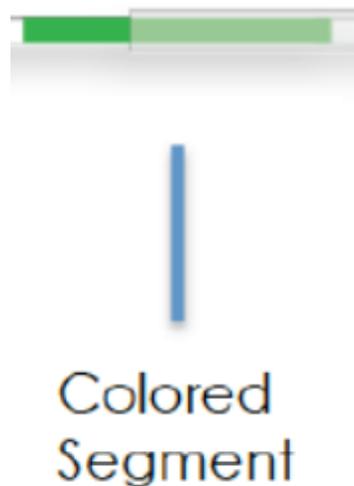


Figura 2-23. Colored Segment (SafeSpeed), [13].

- **Protector Cap (D):** es uno de los componentes de mayor importancia en el SafeSpeed device pues su función es proteger el capilar y, por consiguiente, evitar que se formen tronchamientos en él; ya que una deformación en el capilar puede generar daños en los oocitos almacenados u obstruir el conducto.



Figura 2-24. Protector Cap (SafeSpeed), [13]

- **Pajuela Principal (A):** conducto de sección circular cuya longitud se extiende desde que el capilar deja de estar expuesto al medio exterior hasta el final del SafeSpeed donde se localiza el postizo.
- **Capillary (C):** el capilar es el componente vital del SafeSpeed pues, en su interior, es donde se alojarán las células destinadas al proceso de criopreservación. El capilar cuyo diámetro es de orden micrométrico tiene una longitud de 71mm , de los cuales sólo 24mm son visibles a simple vista, tal y como se observa en la imagen inferior. Esta zona sólo se encuentra protegida por el Protector Cap por ello cuando se está manipulando el SafeSpeed es necesario hacerlo con cuidado evitando en todo momento dañar el capilar dado que ello provocaría la inutilización del mismo.

En el capilar se pueden apreciar tres marcas negras cuya importancia se describe a continuación:

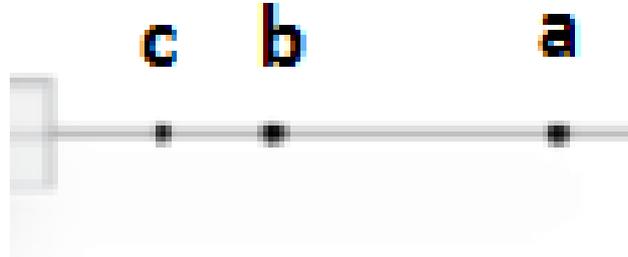


Figura 2-25. Marcas de seguridad en el capilar (SafeSpeed)

a: esta marca indica la zona sobre la cual se debe realizar el sellado; cuando se sella el capilar este pasa de tener una sección circular a una sección con tendencia cónica; por ello, es necesario que entre la zona de posicionamiento del oocito y la zona de sellado exista una distancia de seguridad para que al realizar el corte del capilar para la expulsión del óvulo este circule sólo por la zona de sección circular sin penetrar en la zona cónica.

b: marca a partir de la cual se debe posicionar el oocito que se quiere someter al proceso de vitrificación.

c: marca límite, el oocito no debe sobrepasar esta zona; para que el proceso se realice con éxito el ovocito debe mantenerse entre las marcas **b** y **c**.

El SafeSpeed es un dispositivo fácil de manejar y de almacenar pues tiene una longitud total de 135mm . El hecho de que sea un sistema completamente cerrado permite evitar el riesgo de contaminación cruzada en ovocitos y embriones; no obstante, esto hace necesario el empleo de un sistema auxiliar de aspiración que permita manipular el óvulo, introducirlo en el dispositivo y posteriormente expulsarlo. Puesto que el objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema de manipulación alternativo estos dispositivos se analizarán en los sucesivos apartados de manera independiente.

El SafeSpeed es un método de criopreservación de oocitos con elevadas tasas de supervivencia, hecho que se refleja en las siguientes imágenes cuya fuente es la Spin-off SafePreservation creada a partir de un arduo trabajo de investigación en la Escuela de Ingenieros de la Universidad de Sevilla.

Alpha Scientists Consensus on Oocytes Key Performance Indicator Values			
	Competence Value	Benchmark Value	SafeSpeed Performance
Morphological survival	70%	95% for donors <30 years	95.9% ✓
Cleavage Rate	10-30% lower than that for the comparable population of fresh embryos at the center	The same as for the comparable population of fresh embryos at the center	Similar rates to fresh embryos ✓
Embryo Development and quality	10-30% lower than that for the comparable population of fresh embryos at the center	The same as for the comparable population of fresh embryos at the center	Similar rates to fresh embryos ✓

Figura 2-26. Resultados SafeSpeed, [13].

Uno de los valores más significativos de la tabla superior es que a nivel morfológico la tasa de supervivencia de los oocitos empleando el método SafeSpeed es superior al 90%, por lo que genera una clara competencia al método Cryotop. En referencia a la calidad y posterior desarrollo de los embriones el método SafeSpeed ofrece resultados similares a los que se podrían obtener con embriones frescos, es decir, embriones que no han sido sometidos a ningún proceso de criopreservación previo.

Por otra parte, con la colaboración del centro de Reproducción Asistida Ginemed, se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre la viabilidad de oocitos frescos frente a oocitos que han sido previamente vitrificados mediante el método SafeSpeed. En teoría, siguiendo los resultados de la tabla superior estos deberían ser bastante similares; no obstante, a continuación, se muestra un gráfico en el que se pueden apreciar los resultados de dicho estudio.

Comparison of fresh and vitrified donor oocytes

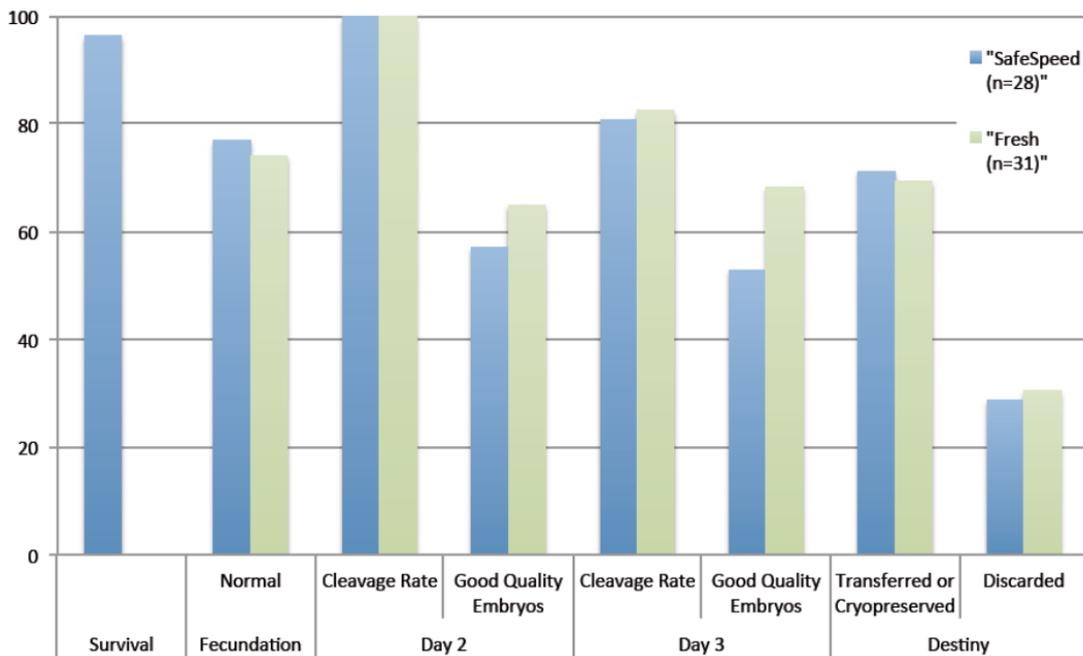


Figura 2-27. Oocitos vitrificados con SafeSpeed vs oocitos frescos, [13].

A la vista de los resultados el método SafeSpeed es un método que ofrece garantía y calidad. No obstante, siempre se busca optimizar al máximo los dispositivos y procedimientos para lograr los mejores resultados posibles. Por ello, se ha analizado tanto el dispositivo SafeSpeed device como los sistemas de aspiración asociados al mismo y se han planteado una serie de cambios con el objetivo de mejorar el diseño y los resultados.

3 NUEVO PROTOTIPO DE SAFESPEED

A lo largo del presente curso 2015-2016, se han ido desarrollando mejoras en el sistema de criopreservación SafeSpeed. Fue necesario recurrir al concepto de ingeniería concurrente pues todos los dispositivos que intervienen en el proceso están relacionados entre sí. Por una parte, se llevó a cabo el desarrollo de una SafeSealer alternativa, se pasó de tener una selladora manual a un prototipo de selladora automática que mejoraba la calidad de sellado alcanzada hasta la fecha; Por otra parte, y bajo mi responsabilidad, recaía el rediseño de algunas mejoras en el dispositivo SafeSpeed device, así como el desarrollo de un sistema de aspiración alternativo al actual.

Para llevar a cabo la realización de los nuevos planos del prototipo del SafeSpeed Device se hizo uso del programa de diseño asistido por ordenador AUTOCAD. En este proyecto no se incluirán los planos completamente acotados pues fueron elaborados para SafePreservation. No obstante, se hará alusión a las modificaciones correspondientes.

3.1 Modificaciones de la pajuela principal del SafeSpeed.

El SafeSpeed device que se emplea actualmente en las clínicas de reproducción asistida tiene una longitud de 135mm. La parte interna está constituida por el capilar y por la pajuela principal, esta última tiene una longitud de 111mm y como se aprecia en las siguientes imagenes el extremo izquierdo finaliza antes del propio extremo del SafeSpeed.

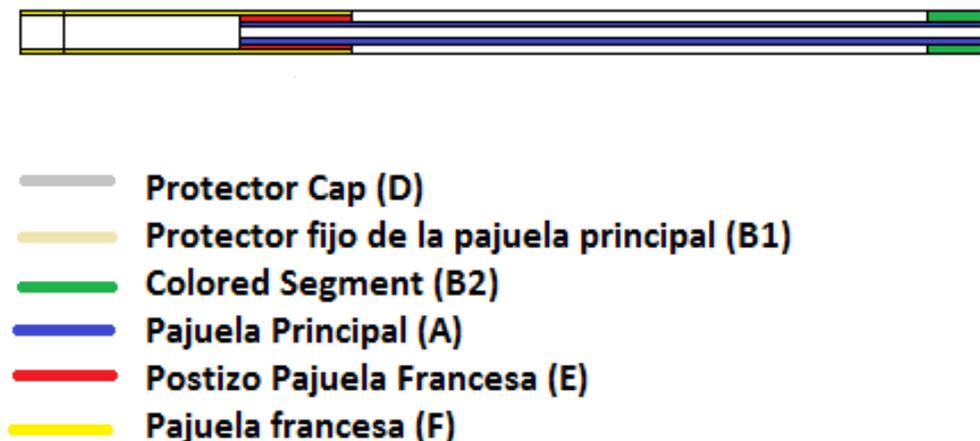


Figura 3-1. Zoom zona Postizo SafeSpeed

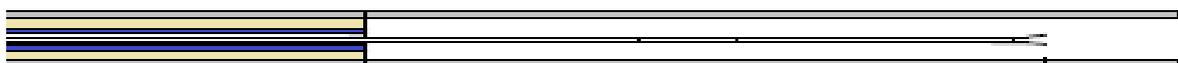


Figura 3-2. Zoom zona Capilar SafeSpeed

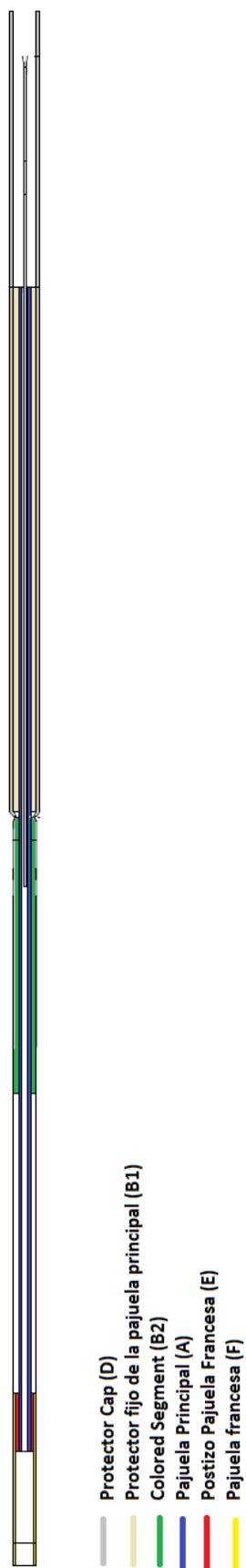


Figura 3-3. SafeSpeed Device

El SafeSpeed está diseñado para que, una vez que se selle el capilar y el postizo, quede herméticamente cerrado. Sin embargo, tal y como se aprecia en la imagen anterior, en el hipotético caso de que debido a los procesos de enfriamiento y calentamiento ultrarrápidos se produjera holgura o fisuras entre la zona de la pajuela francesa, postizo y zona de escritura, podrían producirse filtraciones hacia el interior de la pajuela principal desembocando en el capilar. Una vez analizada la estructura del dispositivo, el objetivo reside en plantear un nuevo prototipo en el cual se reduzca aun más la posibilidad de que se produzca una contaminación de la muestra; entendiéndose por ello evitar cualquier tipo de contacto con el medio externo una vez que el ovocito ya se encuentra dentro del capilar.

En la siguiente figura se muestra el nuevo concepto de SafeSpeed. Este prototipo tiene una longitud de 135mm, manteniendo así las dimensiones originales. Como ahora el sellado de la parte posterior se realiza directamente sobre la pajuela principal, la pajuela francesa pasa a tener una función de anillo de presión para el anclaje del sistema de aspiración. Debido a esto fue posible reducir la longitud de la pajuela francesa a la mitad, igualando su longitud con la de su propio postizo, y prolongar así la pajuela principal hasta alcanzar los 135mm originales.



Figura 3-4. Prototipo SafeSpeed



Figura 3-5. Zoom pajuela principal, nueva zona de sellado, SafeSpeed

En la ampliación del extremo izquierdo del SafeSpeed se puede apreciar mejor como la pajuela principal sobresale del cuerpo central del dispositivo quedando expuesta al exterior. Esa longitud añadida debe ser suficiente para poder llevar a cabo un correcto sellado de la misma, garantizando condiciones herméticas de almacenamiento y no debe sobrepasar cierta dimensión que pueda dar lugar a condiciones de pandeo o rotura por flexión.

Esta posible modificación del SafeSpeed device afecta a dos dispositivos complementarios: la selladora y el sistema de aspiración. En el prototipo de SafeSealer automática debe modificarse la configuración de la selladora del postizo para que ahora lleve a cabo el sellado de la pajuela principal; para ello, será necesario adaptar la temperatura y el tiempo de sellado a este nuevo material. Es importante destacar que la pajuela principal es menor diámetro que la francesa y el material es más resistente al aplastamiento, por ello la técnica de sellado será más compleja. Se observa en los ensayos de laboratorio como al aplicar demasiada temperatura se produce el corte de la pajuela antes de ser sellada; por ello la técnica consistirá en derretir el plástico y a continuación ejecutar el aplastamiento.



Figura 3-6. Sellado de la pajuela principal, SafeSpeed.

Por otra parte, en el sistema de aspiración ha de tenerse en cuenta tanto la adaptación, si fuera necesaria, del anclaje *SafeSpeed- Sistema de aspiración* como el hecho de que, en este nuevo prototipo, el fluido sólo circulará por la pajuela principal y el capilar.

3.2 Modificaciones en el Protector Cap del SafeSpeed.

En sintonía con el apartado anterior y buscando mejoras en el dispositivo, el objetivo principal de esta nueva modificación es aumentar la longitud del Protector Cap 3mm. En el SafeSpeed actual, una vez retirado el protector, el capilar queda completamente al descubierto; sin embargo, tras realizar varios análisis en el laboratorio se observa que una configuración como la que se muestra en la siguiente imagen resulta bastante atractiva por varios motivos.



Figura 3-7. Protector Cap, SafeSpeed Device

En la figura se aprecia como el capilar queda parcialmente protegido por el Protector Cap, situación que se consigue evitando desplazar el protector hasta el final de su recorrido. No obstante, resulta más cómodo aumentar la longitud del protector tal que al retirar el mismo hasta el final de su carrera este cubra parcialmente al capilar. Esta configuración permite dos tipos de mejoras sustancialmente importantes. Por una parte, permite evitar el deterioro o tronchamiento del capilar,

mientras que por otra permite aumentar el ángulo del dispositivo respecto a la placa petri durante su manipulación.

Las ventajas, anteriormente descritas, se muestran en la siguiente imagen:

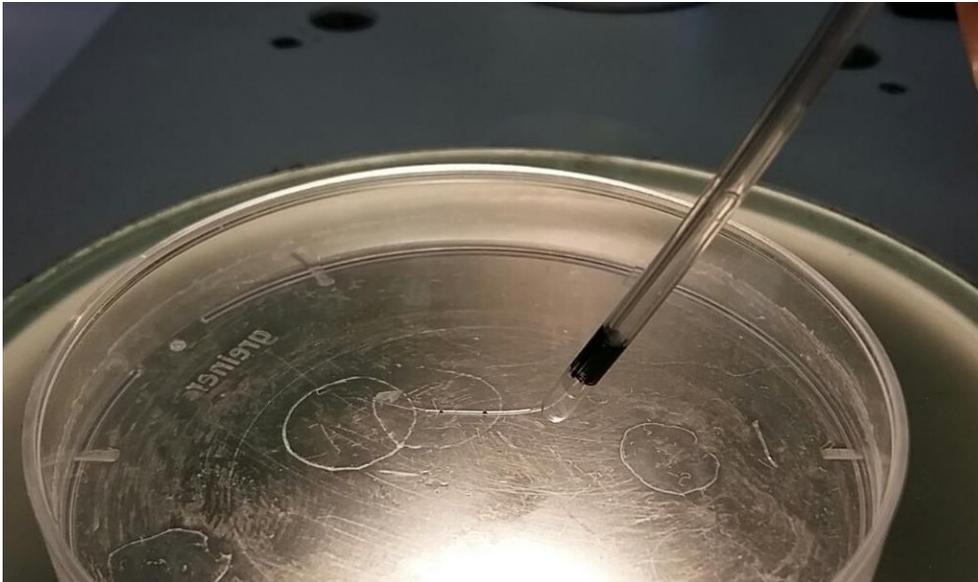


Figura 3-8. Evitar tronchamiento del capilar, SafeSpeed Device

En la figura se puede observar como el ángulo de manipulación del SafeSpeed respecto a la placa petri es ligeramente superior a 45° y, gracias a la protección del Protector Cap, el capilar no se deteriora.

En la nueva situación surge una controversia y es que la distancia entre las marcas negras de seguridad del capilar y la zona de mala transferencia térmica se ha reducido. Este es un punto de vital importancia para que el proceso de criopreservación se lleve a cabo con éxito; por ello, es necesario que el margen de seguridad en la transferencia térmica sea el mismo que se tiene en el SafeSpeed actual. Para conseguir esto es necesario aumentar la longitud del capilar 3 mm al igual que se hizo con el portector, de tal forma que las cotas entre capilar y protector se mantengan constantes. Este incremento implica que la distancia entre el extremo de la pajuela principal y la primera marca negra se incremente a 11 mm tal y como se muestra en la siguiente imagen:

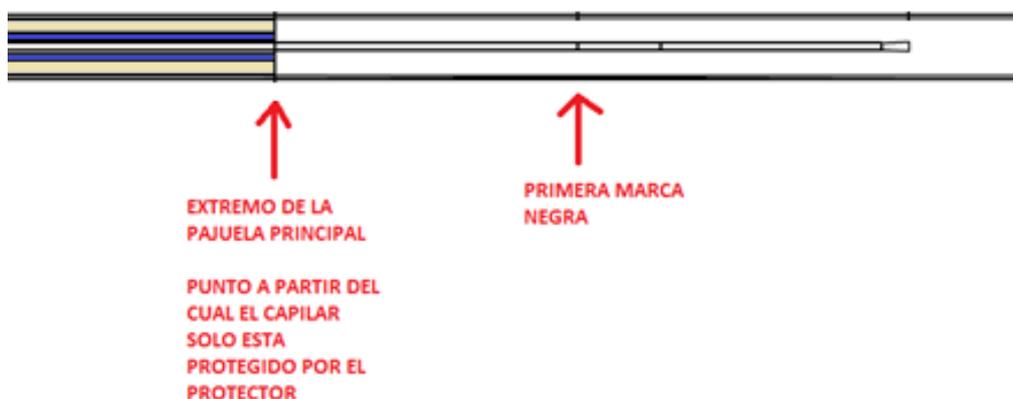


Figura 3-9. Aumento del Protector Cap, SafeSpeed Device

A colación de las modificaciones realizadas en el SafeSpeed y de la implementación de la selladora automática y del sistema de aspiración es necesario modificar los colores que constituyen cada segmento del dispositivo de almacenamiento.

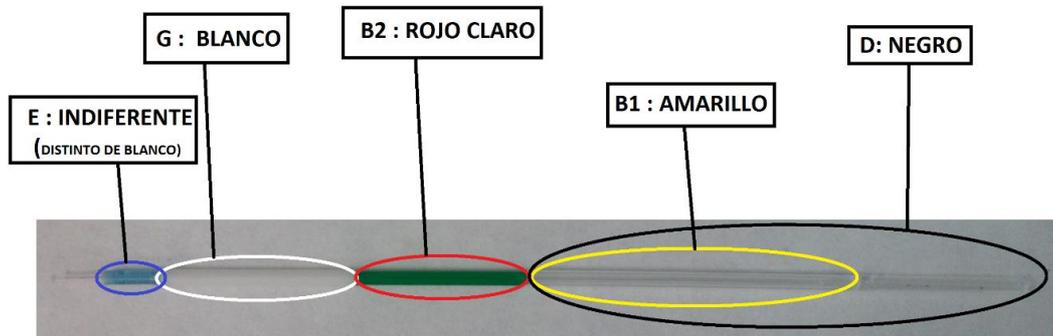


Figura 3-10. Nueva disposición de colores, SafeSpeed Device.

Segmentos	Coloración	Función/ventaja
E: anillo de sujeción al Sistema de aspiración	Distinto de blanco	Su función es servir de anclaje al Sistema de aspiración; debe poder distinguirse de la zona de escritura
G: Writing Area	Blanco	Zona de identificación
B2: Colored Segment	Rojo claro	El color rojo contrasta con el negro del protector y permite saber si este está protegiendo al capilar o no
B1: Protector fijo de la pajuela principal	Amarillo	Destaca frente al rojo y negro lo que permite detectar si el protector cap está más allá de su posición ideal
D: Protector Cap	Negro	Dado que el Nuevo prototipo de selladora automática dispone de fotorresistencias para detectar la posición del capilar; el negro permite una detección más eficiente.

Tabla 3-1: Disposición de colores del nuevo prototipo de SafeSpeed

4 SISTEMA DE ASPIRACIÓN

El sistema de aspiración es una parte muy importante del SafeSpeed device pues sin él no es posible introducir los ovocitos en el interior del capilar. El objetivo de este proyecto abarca el estudio de los actuales sistemas de aspiración y la implementación de un nuevo sistema que aumente la rapidez y sencillez del procedimiento, manteniendo en todo momento la fiabilidad del mismo.

4.1 SafeSpeed: Sistemas de aspiración actuales.

Actualmente, los laboratorios de reproducción asistida que emplean el método de criopreservación SafeSpeed disponen de dos tipos de sistemas de aspiración diferentes. A continuación, se describe brevemente cada uno de ellos:

- *Sistema de aspiración por boca:* es uno de los sistemas más empleados en los laboratorios de reproducción asistida que emplean la técnica SafeSpeed. Este sistema consta de: un conector que permite su anclaje al dispositivo de almacenamiento, un tubo de silicona y filtros estándar estériles de 22 micras.



Figura 4-1. Sistema de aspiración por boca.

Este método consiste en introducir el oocito en el capilar y controlar su posición en el mismo a partir de técnicas bucales. La lengua será el órgano ejecutor del movimiento de

la célula en el capilar gracias al taponamiento o destaponamiento del orificio de la boquilla.

El éxito de su uso radica en que, al emplear la boca, siempre se dispone de una mano libre para labores auxiliares, pues la otra mano se destina a la propia manipulación del SafeSpeed. No obstante, a pesar de que se emplean filtros para evitar posibles transmisiones de virus o contaminaciones en la muestra, no deja de ser una técnica de la que algunos países rehusan.

- **Microaspirador o micromaniulador:** este mecanismo, de uso manual, permite introducir las muestras en el SafeSpeed device mediante la regulación de la presión del mismo con el dedo pulgar.



Figura 4-2. Sistema de aspiración mediante micromanipulador.

Este sistema de aspiración evita posibles contaminaciones de la muestra pues es un circuito cerrado tal que los oocitos no entran en contacto con agentes externos. Sin embargo, dadas sus dimensiones, resta sencillez en el procedimiento.

Este sistema puede emplearse en dos modalidades: o bien el SafeSpeed va conectado directamente al extremo del micromanipulador de tal forma que el dispositivo resultante se maneja con una sólo mano o, entre el micromanipulador y el sistema de almacenamiento, se dispone de un trozo de tubo de tal forma que con una mano se maneja el SafeSpeed y con la otra el sistema de aspiración. La más usual suele ser la primera, pero el sistema resultante tiene la desventaja de que a pesar de estar diseñado para manejarlo con una sola mano esto puede reducir la precisión en el manejo del capilar del SafeSpeed dada la lejanía entre en punto de agarre del dispositivo y el punto de precisión que es el orificio de entrada del capilar.

Durante el desarrollo de este proyecto fue necesario, en primer lugar, realizar un montaje de los dispositivos anteriormente descritos para poder así discernir las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos. Cabe destacar que el tiempo de aprendizaje del sistema de aspiración con micromanipulador es ligeramente inferior al método de boca; sin embargo, una vez familiarizado la técnica, este último es más práctico.

4.2 Introducción a la microfluídica del SafeSpeed.

La microfluídica es la parte de la Mecánica de Fluidos que se encarga del estudio de los fluidos a nivel micrométrico. A esta escala, el comportamiento de los fluidos es ligeramente distinto al usual; Por ejemplo, hay microcanales en los que el Número de Reynolds es tan bajo que el fluido permanece en régimen laminar sin que aparezcan fluctuaciones que den lugar a régimen turbulento. Las propiedades de los fluidos también pueden experimentar cambios en su comportamiento, un ejemplo de ello es la tensión superficial o la capacidad que tienen los fluidos de disipar la energía.

En el proceso de vitrificación lo ideal es que la cantidad de medio que acompañe al óvulo sea mínima por ello el SafeSpeed está diseñado de tal forma que, al introducir el oocito en el dispositivo de almacenamiento, la cantidad de crioprotector que penetra en el capilar sea más que suficiente.



Figura 4-3. Parte visible del capilar del SafeSpeed.

El capilar se caracteriza por ser un microtubo que tiene una longitud al descubierto de 20 mm y cuyo diámetro es del orden de $167\text{ }\mu\text{m}$, por lo que el volumen de medio que se introduce en el interior del mismo será inferior a 11 mm^3 .

El proceso de criopreservación debe caracterizarse por ser rápido, sencillo y limpio. Por ello, los conductos que constituyen el SafeSpeed y el sistema de aspiración deben contener aire y ningún otro tipo de fluido. De este modo la interfase cuyo movimiento queremos controlar será del tipo líquido-aire, siendo el líquido la mínima cantidad de medio que acompaña al óvulo en el capilar. Es importante destacar que, para la realización de este proyecto no se ha hecho uso de ningún tipo de material biológico, es decir, en los ensayos de carga y descarga del SafeSpeed sólo intervinieron las soluciones de vitrificación que se elaboraron para tales efectos.

El objetivo principal es desarrollar un sistema de aspiración que permita controlar la interfase aire-líquido en todo momento durante los procesos de carga y descarga del dispositivo de almacenamiento. Es importante que dicho control contemple, simultáneamente, las variables de posición y velocidad.

- **Control en posición:** el SafeSpeed consta de tres marcas negras, la primera indica el punto de sellado y las otras dos, que se encuentran a menor distancia entre ellas, indican las cotas mínima y máxima para posicionar el óvulo. De este modo, los oocitos que se vayan a vitrificar empleando el SafeSpeed nunca deben posicionarse antes de la segunda marca ni más allá de la tercera.

¿A qué puede dar lugar un error en el posicionamiento del óvulo? A priori, el proceso de criopreservación no tendría el éxito esperado. Por una parte, si el óvulo se posicionara entre la primera y la segunda marca negra, a la hora de realizar el sellado el calentamiento que se produce y el estrechamiento del capilar podrían dañar la célula debido a que esta esté situada muy cerca de dicho punto. Por otra parte, podría darse la situación de que el oocito se encuentre más allá de la tercera marca negra, bajo estas condiciones el proceso de sellado no afectaría a la célula, pero durante la vitrificación el óvulo se encontraría muy cerca de la zona de mala transferencia térmica⁶, por lo que el proceso de criopreservación no sería exitoso debido a que el proceso de enfriamiento ultrarrápido vería mermada la calidad sus resultados. Lo expuesto anteriormente reafirma la necesidad de disponer de sistemas de aspiración que permitan tener un control del posicionamiento de la entrefase lo suficientemente preciso para que los embriólogos puedan situar el oocito correctamente.

- **Control en velocidad:** el tiempo transcurrido para posicionar el óvulo entre las marcas negras no debe ser muy elevado. No obstante, dado que el mecanismo para la detección del buen posicionamiento del óvulo es el ojo humano, la velocidad debe ser tal que permita una correcta detección del mismo.

¿Qué puede ocurrir si la velocidad que es capaz de proporcionar el sistema de aspiración no es la adecuada? Una velocidad adecuada para el sistema de aspiración es aquella que permite un movimiento suave de la entrefase y, una vez que se detecta que el óvulo está en la posición idónea, permite parar el movimiento de la misma. Si la velocidad que se le proporciona a la entrefase es demasiado lenta posiblemente se tenga mayor capacidad de posicionamiento del oocito, pero en un laboratorio un sistema que relentice el trabajo no resulta exitoso. En segundo lugar, puede ocurrir que al accionar el sistema de aspiración la velocidad de la entrefase sea tan elevada que no se tenga la capacidad suficiente de detenerla a tiempo y, como consecuencia de ello, el oocito se desplace tan rápido por el capilar que se sitúe más allá de la tercera marca negra. La situación anterior provoca tener que destinar segundos a mayores a posicionar el óvulo correctamente por lo que, de nuevo, estamos ante una situación que relentiza el trabajo. Por último, es importante resaltar que serán los ensayos de laboratorio con los diferentes tipos de sistemas los que permitan comprobar si el control de la posición es viable con la velocidad que pueda proporcionar dicho sistema.

Como se ha visto con anterioridad el sistema de aspiración permite introducir los oocitos en el interior del capilar del SafeSpeed, pero también permite la expulsión de los mismos. Por ello, una vez que se desarrolla un sistema que permite el correcto control de posición y velocidad de la entrefase, es necesario que dicho sistema también permita la correcta expulsión del oocito.

⁶ Zona de mala transferencia térmica: en el Safespeed se conoce como la parte del mismo a partir de la cual el capilar deja de estar expuesto al exterior, es decir, el punto a partir del cual la pajuela principal empieza el recubrimiento del capilar.

4.3 El laboratorio y su entorno.

El laboratorio es un espacio dotado del equipamiento necesario para desarrollar investigaciones y ensayos científicos o tecnológicos, por ello la parte práctica de este proyecto se desarrollará en un entorno de estas características. Es de vital importancia destacar que entre los objetivos principales de este proyecto se encuentra el de abaratar los costes del mismo. A consecuencia de esto, será necesario construir un dispositivo sencillo que reproduzca el mecanismo del SafeSpeed, así como elaborar soluciones cuyas principales propiedades coincidan con las de los medios de vitrificación.

En el desarrollo del presente TFG es necesario familiarizarse con dispositivos y utillajes propios de un laboratorio. A continuación, y en los siguientes apartados, se irá haciendo referencia a algunos de ellos.

- **Microscopio:** dadas las dimensiones del capilar este dispositivo permite la correcta focalización del movimiento de la interfase en el capilar. Trabajar a simple vista resulta imposible ya que, aún siendo capaces de visualizar la interfase, tener que focalizar el ojo en algo tan diminuto cansa la vista. Además, si se estuviese trabajando directamente con material biológico, con oocitos, este dispositivo resultaría indispensable.
- **Placa Petri:** recipiente de plástico sobre el cual se posicionan las diferentes muestras de medio. Es interesante que sean amplias porque facilita la manipulación del SafeSpeed y también se consigue evitar el choque del capilar en las paredes de la misma.

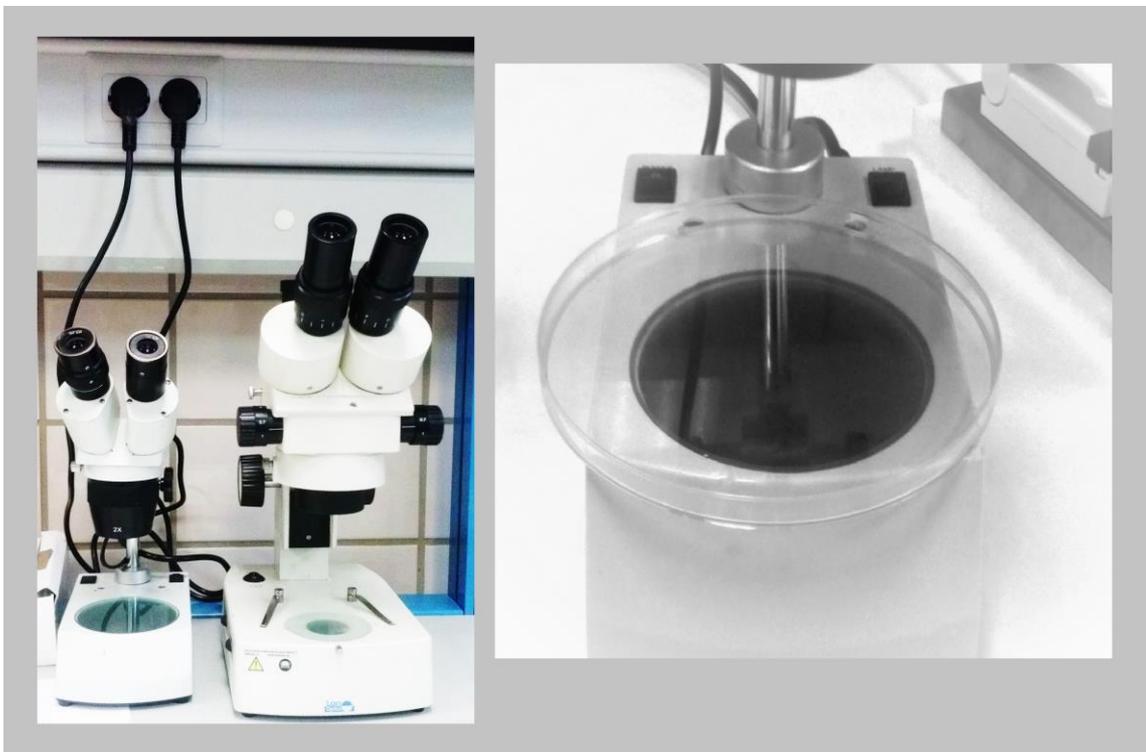


Figura 4-4. Microscopios y Placa petri.

4.3.1 Elaboración de pajuelas para ensayos de laboratorio.



En el transcurso del proyecto será necesario elaborar manualmente pajuelas destinadas a los diferentes ensayos de laboratorio. En primera instancia lo que se quiere analizar bajo el microscopio es el movimiento de la interfase aire-líquido en el capilar, para ello es imprescindible que el capilar que se use para los ensayos tenga el mismo diámetro interno que el original del SafeSpeed. Una vez seleccionado el capilar se corta un trozo de longitud equivalente al del SafeSpeed y se pega a la típica pajuela del almacenamiento de semen, en el otro extremo de dicha pajuela será necesario acoplar un pequeño trozo de pajuela principal para poder realizar los ensayos de sellado con el prototipo de la nueva selladora automática. Si bien es cierto, que con esta pajuela sólo nos haremos una idea aproximada del comportamiento del fluido en el capilar, dado que los volúmenes internos no coinciden exactamente con los del SafeSpeed, por lo que para el correcto testeo del sistema de aspiración será necesario el empleo del SafeSpeed device sin esterilizar, puesto que en ningún momento se va a utilizar con material biológico.

Figura 4-5. Pajuelas para ensayos de sellado.

4.3.2 Elaboración de la solución de vitrificación para ensayos de laboratorio.

Los medios de vitrificación o calentamiento tienen una serie de propiedades que, como ya se ha descrito previamente en este documento, favorecen el proceso de criopreservación; reduciendo, por ejemplo, las probabilidades de formación de cristales de hielo intra o extracelulares.

Hasta el momento se tienen dos conceptos claros, no se va a emplear material biológico en los ensayos y uno de los objetivos es abaratar los costes de los mismos. Entonces, si se necesita una interfase aire-líquido *¿Por qué no emplear agua para los ensayos?*

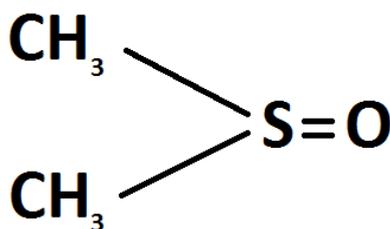
La respuesta radica en que las propiedades de los fluidos son diferentes; esencialmente la tensión superficial y, en consecuencia, la capilaridad.

El agua no es válida para realizar los ensayos porque tiene mayor tendencia a la ascensión por capilaridad, es decir, una vez que se produce el contacto entre el orificio de entrada del capilar y el agua esta empieza a introducirse en el mismo hasta alcanzar una cota superior a la que se alcanza con los medios de vitrificación. Además, los medios de vitrificación tienen una componente de sacarosa, azúcar, que implica que tengan una textura más viscosa. Puesto que el sistema de aspiración debe diseñarse para ser capaz de vencer la tensión superficial del fluido y controlar el movimiento de la interfase, es de vital importancia que el fluido que se emplee como modelo tenga propiedades similares a las de los medios originales.

El procedimiento seguido en el laboratorio, así como los componentes que constituyen dicha solución se describirán, paso a paso, a continuación.

Para llevar a cabo las sucesivas pruebas será más que necesario elaborar una cantidad inicial de 100 ml de solución de vitrificación, la cuál estará constituida por: PBS, DMSO, Etilenglicol y Sacarosa.

- **Buffer Fosfato Salino (PBS):** también denominada Tampón Fosfato Salino es una solución acuosa amortiguadora de pH, pues los grupos fosfato que la constituyen mantienen el pH estable, siendo su nivel de pH de 7.4. Se caracteriza por tener una osmolaridad⁷ y concentración de iones (Na^+ , K^+ y Cl^-) semejante a la del líquido extracelular⁸ de los mamíferos, es isotónica⁹ y no resulta tóxica para estos. Los componentes básicos a partir de los cuales se prepara el PBS son: fosfato sódico, cloruro de potasio y cloruro sódico; no obstante, en determinadas formulaciones también aparece el fosfato de potasio.
- **Dimetil Sulfoxido (DMSO):** es un compuesto orgánico, líquido e incoloro que fue descubierto por Saytzeff en 1866. Se obtiene como subproducto en el proceso de manufactura del papel, en concreto, durante el procesamiento de la madera para la fabricación de la pulpa de celulosa. Tiene usos variados dentro del ámbito de la medicina o ingeniería. En este caso, gracias a su propiedad cologativa, se emplea como agente crioprotector pues disminuye la cantidad de agua absorbida por los cristales de hielo previniendo así su formación. Otra de sus propiedades es que tiene la capacidad de atravesar rápidamente las membranas celulares lo que permite su actuación dentro de la célula.



Dimetil Sulfoxido: C₂H₆OS

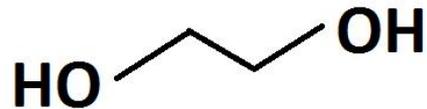
Figura 4-6. DMSO, dimetil sulfóxido.

- **Etilenglicol:** es un compuesto químico que se caracteriza por ser: líquido, transparente e inodoro y pertenecer al grupo de los dioles. Fue elaborado por primera vez en 1859 y, entre sus primeros usos industriales, destacó como un compuesto intermedio para explosivos durante la Primera Guerra Mundial. Actualmente, destaca por su uso como anticongelante y en el caso que nos ocupa actúa como agente crioprotector. Un aspecto interesante a destacar es su toxicidad, ya que si se ingieren grandes cantidades de este compuesto los resultados pueden dar lugar incluso a muerte.

⁷ Osmolaridad: también denominada concentración osmótica, se define como el número de osmoles de soluto por litro de solución. Es una medida de la concentración de solutos. Los osmoles se pueden definir como la cantidad de iones en los que se disocia una molécula al disolverla en el agua. Por ejemplo: cuando se disuelve cloruro sódico en agua se obtienen dos iones cargados eléctricamente, (Na^+ y Cl^-) de esta forma cada mol de cloruro sódico da lugar a dos osmoles en disolución.

⁸ Líquido extracelular: aquel que no se encuentra en el interior de las células. En los mamíferos está constituido por el plasma sanguíneo y el líquido intersticial, siendo este último el que ocupa el espacio entre las células.

⁹ Solución isotónica: es aquella que se caracteriza porque dentro y fuera de la célula tiene la misma concentración de soluto, es decir, la concentración de soluto permanece constante.



1,2-Etanodiol: $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$

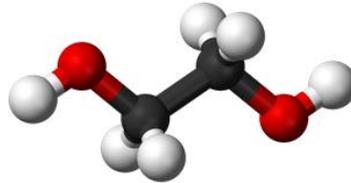
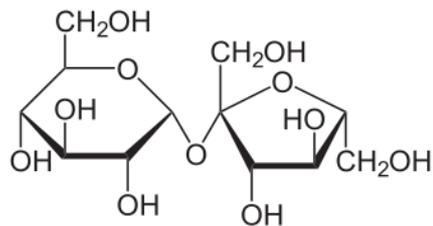


Figura 4-7. Etilenglicol, [19].

- **Sacarosa:** es un disacárido de glucosa y fructosa. Se puede obtener a partir de la caña de azúcar, de la remolacha o del maíz. Uno de sus usos más extendidos es como edulcorante, sin embargo, en las soluciones de vitrificación actúa como agente crioprotector.



Sacarosa: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

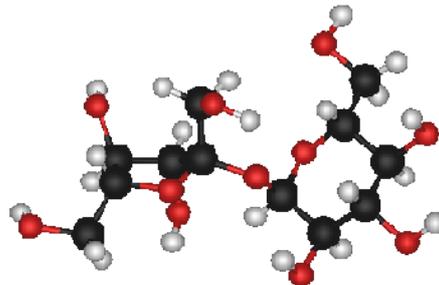


Figura 4-8. Sacarosa, [19].

Para la realización de la muestra 100 ml de solución de vitrificación es necesario mezclar los componentes anteriores siguiendo un determinado orden y, evidentemente, tomando las cantidades adecuadas. Como se ha descrito previamente el DMSO, el etilenglicol y la sacarosa actúan como agentes crioprotectores por lo que el PBS constituirá la base de la solución. A continuación, se recoge en una tabla las cantidades necesarias de cada compuesto, así mismo, también se describirá el proceso a seguir para la elaboración del VS (Vitrification Solution).

Componentes	Porcentaje de componente presente en la Solución de Vitriificación	Cantidad de componente para preparar 100 ml de Solución de Vitriificación
PBS	70%	70 ml
DMSO	15%	15 ml
Etilenglicol	15%	15 ml
Sacarosa	-	17.11 g

Tabla 4-1: Solución de vitriificación: sustancias y cantidades necesarias para su elaboración.

❖ VITRIFICATION SOLUTION (VS)



Figura 4-9. Material necesario para la elaboración de VS.

- 1- Preparar el espacio de trabajo y tomar las medidas de seguridad necesarias. Por ejemplo: a pesar de que ningún compuesto es nocivo se aconseja el uso de guantes.

- 2- En un vaso de precipitado se añaden 50 *ml* de PBS
- 3- Se añaden el primer crioprotector, 15 *ml* de DMSO
- 4- Se disuelve con ayuda de un agitador magnético; Sólo una vez que la mezcla sea homogénea, es decir, que la solución sea vea transparente se continúa con el siguiente paso.



Figura 4-10. Agitador magnético.

- 5- Se añade el segundo crioprotector, 15 *ml* de Etilenglicol.
- 6- De nuevo se hace uso del agitador magnético para la disolución de los componentes; cuando la solución se vea transparente es señal de que la disolución se ha ejecutado bien, en caso contrario, es necesario accionar el agitador más tiempo.
- 7- El último crioprotector es la Sacarosa, puesto que se encuentra en estado sólido se hace uso de una balanza electrónica para pesar los 17.11 *g* y posteriormente añadirlos a la solución.



Figura 4-11. Balanza electrónica.

- 8- Se procede, de nuevo, a la disolución del crioprotector: la Sacarosa.
- 9- Antes de dar por finalizado el proceso es necesario enrasar la solución hasta los 100 ml. Para ello se añade la solución base restante, en este caso PBS.
- 10- Por último, con ayuda del agitador magnético se disuelve la solución por completo y, una vez que esta sea completamente transparente, se vierte en viales (con tapón de rosca) y se almacenan en el frigorífico, pues a temperatura ambiente podrían verse mermadas sus propiedades.



Figura 4-12. Viales para conservar las muestras.

Para finalizar este apartado se procede, a continuación, a realizar dos puntualizaciones importantes y que es conveniente tener presentes a la hora de trabajar en un laboratorio con productos químicos:

- Por una parte, como ya se ha descrito con anterioridad deben primar las medidas seguridad y, aunque no se ha mencionado hasta el momento, conviene saber que hay determinadas mezclas de sustancias que emiten ciertos gases u olores característicos por ello se recomienda que dichas mezclas se realicen bajo la campana de extracción de gases.
- Por otra parte, es importante recordar que, para la correcta identificación de las muestras en el laboratorio, es de vital importancia etiquetar los viales con el nombre de la solución y la fecha de fabricación de la misma, en algunas ocasiones, también es conveniente añadir el nombre de la persona que se encargó de su elaboración. Las muestras permanecerán almacenadas en el frigorífico junto con muchas otras y, en caso de no estar identificadas correctamente posiblemente se proceda a desecho, pues podría no saberse a ciencia cierta de que sustancia se trata. A colación de esto, es muy importante recordar que no debería hacerse uso en el laboratorio de ninguna sustancia que no se encuentre debidamente identificada pues, a priori, se puede pensar que es un determinado compuesto y finalmente resulte ser otro que, en el mejor de los casos, solo estropearía la muestra.

4.4 Configuración de los distintos dispositivos ensayados.

El sistema de aspiración es aquel que se encarga del movimiento de la interfase aire-líquido en el capilar del SafeSpeed y, gracias al cual, el óvulo se puede introducir en él.

El principio de funcionamiento de cualquier sistema de aspiración se fundamenta en que el movimiento de dicha interfase, aire-líquido, será provocado por la compresión o descompresión del aire confinado en el interior del conducto.

¿Cómo se puede comprimir o expandir el aire?

Para la compresión o descompresión del aire es necesario disponer de algún tipo de mecanismo que, al accionarlo, reduzca o amplie el volumen de espacio en el que se encuentra confinado el aire. De este modo, cuando el espacio se vea reducido el aire se comprimirá y su tendencia a la expansión provocará el desplazamiento de la interfase aire-líquido hacia el exterior del capilar, en caso contrario, cuando el espacio en el que se encuentra confinado el aire aumente, el resultado será que la interfase iniciará su ascenso por el interior del capilar, esto se debe a que el aire intentará ocupar todo el espacio y, al encontrarse expandido, el líquido puede vencerlo en el movimiento.

¿Qué sistemas se van a emplear para comprimir o expandir el aire?

En el desarrollo práctico de este proyecto se emplearon, básicamente, dos tipos de sistemas completamente diferentes para provocar el movimiento de la interfase; por una parte, se realizó un primer experimento cuyo elemento base será un émbolo y, por otra parte, un segundo experimento que tendrá como elemento principal un bulbo.

Una vez seleccionados los dos tipos de sistemas promotores del movimiento de la interfase, el siguiente paso es diseñar varios prototipos de sistema de aspiración que permitan cargar y descargar el SafeSpeed device. Estos sistemas, como se verá a continuación, pueden ser desde lo más sencillo que se nos pase por la mente, hasta prototipos de mayor complejidad.

Esta sección del proyecto es totalmente experimental y en ella se sigue un razonamiento deductivo, es decir, surge una idea de sistema, se lleva a la práctica el montaje, se realizan las pruebas necesarias y, a colación de los resultados que se observen, el sistema será válido o no. A lo largo del transcurso del proyecto los sistemas probados fueron varios, no obstante, se desarrollarán los principales pues, en la mayoría de los casos, la variante de unos a otros radicaba en el tamaño de los tubos o en el tipo de jeringuillas a emplear.

Es menester puntualizar, que al tratarse de algo experimental el resultado puede resultar satisfactorio o no; en ningún momento está garantizado el éxito del experimento. Si bien es cierto que, en caso de no resultar válido, se podrá puntualizar que es lo que no cumple y en que puntos falla. También se ha de tener en cuenta que, si el prototipo que se haya ideado ofrece resultados similares a los actuales y no mejora ningún aspecto de los mismos no sería válido, pues el objetivo es mejorar el procedimiento actual.

4.4.1 Experimento 1: Basado en el Émbolo

En un primer momento, cuando se dispone de un conducto cerrado en el cual el espacio interior está ocupado por aire y el objetivo es mover dicho aire, comprimirlo o expandirlo, la primera opción que se nos ocurre es emplear un sistema basado en un émbolo, en definitiva, emplear una jeringuilla.

PROTOTIPO A:

En la siguiente imagen se muestra un primer prototipo de sistema de aspiración:

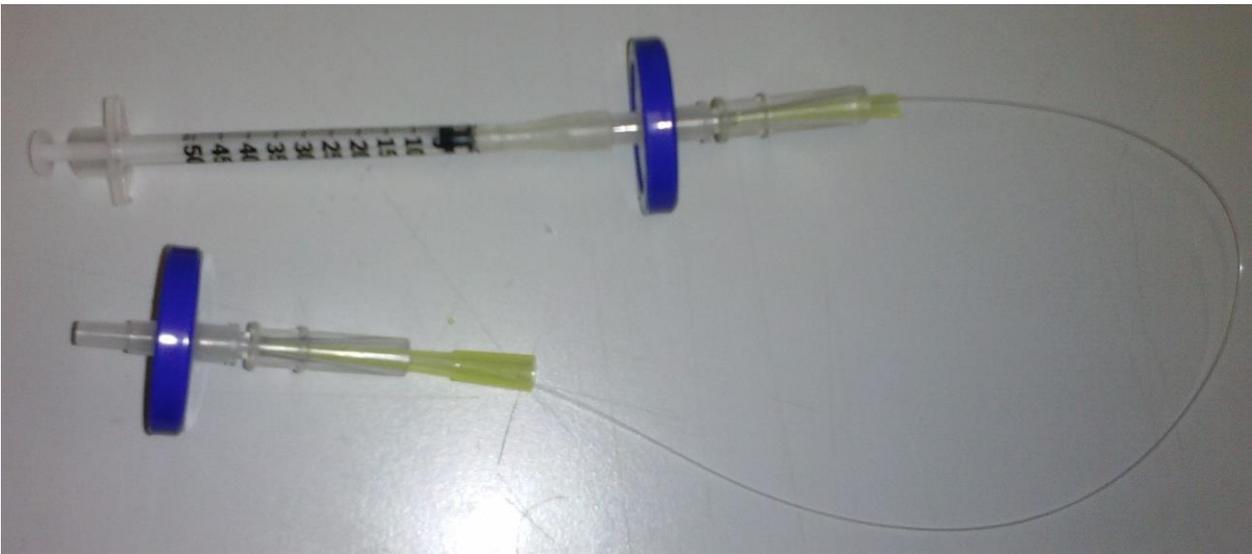


Figura 4-13. Sistema de aspiración. Prototipo A.

Está constituido por:

- Jeringuilla de insulina de 50 ml (es necesario extraerle la aguja para facilitar el acople)
- Conectores
- Filtros
- Tubo capilar de: $\phi_{inner} = 0.28 \text{ mm}$, $\phi_{outer} = 0.61 \text{ mm}$ y una longitud de 24 cm.

La presencia de los filtros resulta innecesaria pues el sistema, a diferencia del sistema de boca, sólo se encuentra abierto por la zona de conexión con el SafeSpeed. No obstante, la presencia o no de estos dispositivos no supone una alteración de los resultados observados.

❖ ENSAYO

En primer lugar, es necesario acoplar la pajuela al sistema de aspiración. Posteriormente, antes de introducir el capilar en la solución de vitrificación, es importante posicionar el émbolo de la jeringuilla a mitad de carrera. El objetivo de este paso radica en que es necesario tener capacidad

para reaccionar ante el movimiento de la interfase por el interior del capilar del SafeSpeed. Si el émbolo no se encontrase parcialmente retraído y fuese necesario frenar el avance de la interfase no sería posible, del mismo modo, si el émbolo se encuentra totalmente retraído y es necesario succionar líquido tampoco sería viable. Una vez puntualizado esto, ya se está en disposición de iniciar el contacto entre el capilar y el VS.

El experimento consiste en visualizar el comportamiento de la interfase aire-líquido a través del microscopio e intentar controlar dicha interfase mediante movimientos longitudinales del émbolo.

❖ RESULTADOS

Lo primero que se aprecia es que lo que parece un procedimiento sencillo en realidad no lo es. La precisión que se tiene con la mano para desplazar el émbolo es deficiente, puesto que se consiguen desplazamientos del mismo más grandes de los deseados. Consecuentemente, se observa que el movimiento de la interfase no es suave y adquiere demasiada velocidad lo que resta capacidad para poder controlar la posición de la misma.

Tras sucesivas pruebas en el laboratorio se concluye que la única vía posible con este tipo de jeringuillas es, en vez de realizar desplazamientos longitudinales, mover el émbolo ligeramente hacia la derecha y la izquierda con el objetivo de que la goma aislante que lleva émbolo en su extremo inicial se desplace una cantidad milimétrica. Con un poco de tiempo y algo de práctica esta técnica acaba resultando sencilla, pero no mejora ni mucho menos la capacidad de control alcanzada con el sistema de boca. Además, la tendencia habitual del uso de una jeringuilla es realizar desplazamientos longitudinales del émbolo por lo que, en las primeras tomas de contacto, podría dar lugar a confusiones y ese es un hecho que no se puede obviar dado el tipo de material con el que se está tratando.

En resumen, con el empleo de jeringuillas de insulina se observa que al desplazar el émbolo se consigue mover la interfase, pero no de la forma deseada; En principio, esto se debe a que la cantidad de volumen de aire contenida en la jeringuilla es elevada, entonces desplazamientos del émbolo de la precisión que nos permite la mano aceleran mucho la interfase. Según esta apreciación lo ideal sería disponer de jeringuillas de menor volumen y de algún dispositivo que permitiese movimientos muy suaves del émbolo, de mayor precisión que la que se puede conseguir con el órgano humano.

PROTOTIPO B:

El objetivo en esta etapa es realizar el montaje de un segundo prototipo en el cual la precisión en el desplazamiento del émbolo no suponga un problema y, por otra parte, también se tiene por objetivo intentar reducir la cantidad de volumen de aire presente en el dispositivo. Para conseguirlo se hará uso de un tornillo micrométrico y de una jeringuilla de 100 μ l.

Es menester hacer una pequeña observación en este punto, tanto en el prototipo A como en el B, se sustituyeron las jeringuillas por otras de mayor o menor volumen, en el primer caso se probó también con jeringuillas de insulina de 100 ml y en este con una jeringuilla Hamilton de 50 μ l. Sin embargo, dado que las variaciones en los resultados no resultaron altamente significativas, se ha procedido a hacer referencia únicamente de uno de los respectivos modelos analizados dentro de

cada prototipo de sistema de aspiración, evidentemente, aquél que presentaba mejores expectativas.

En este segundo prototipo los desplazamientos del émbolo se van a ejecutar a través del uso de un tornillo micrométrico como el de la figura:



Figura 4-14. Tornillo micrométrico.

A la vista de la figura anterior, para poder acoplar el émbolo de la jeringuilla al del tornillo micrométrico será necesario realizar un corte en el mismo y eliminar el tope que trae por defecto. Para ello será necesario emplear una sierra cuya hoja corte el metal, se puede utilizar una sierra automática, no obstante, la que había disponible en el laboratorio era manual. Es muy importante tener presentes las medidas de seguridad, por lo que para evitar cualquier incidente es necesario fijar bien el tornillo micrométrico antes del inicio del corte. También es necesario marcar bien la zona por la que se quiere realizar el corte, en este caso, la señalización se hizo con cinta aislante tal y como se aprecia en la siguiente figura.



Figura 4-15. Fijación del tornillo micrométrico, previa a la realización del corte.



Figura 4-16. Corte para la adaptación del tornillo micrométrico.

En este punto puede surgir la siguiente pregunta *¿Cómo se puede acoplar el émbolo del tornillo micrométrico al de la jeringuilla?*

El pistón del tornillo micrométrico es metálico por lo que la respuesta radica en el empleo de un imán. Además, como este va adherido al extremo del pistón, la carrera del mismo permanece intacta y no se pierden milímetros por el acople. Sin embargo, el extremo del pistón de la jeringuilla no es de carácter magnético por lo que será necesario acoplarle una pletina metálica.

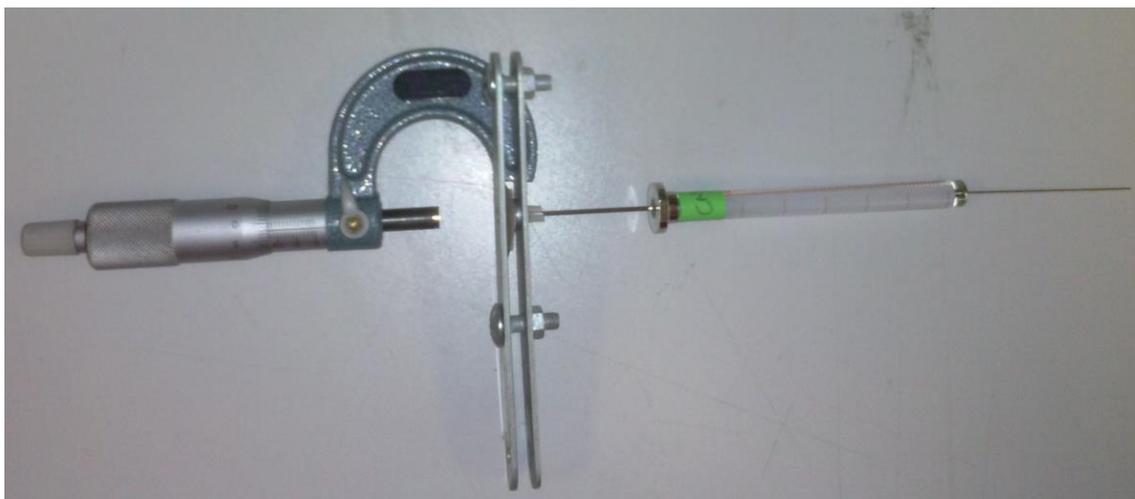


Figura 4-17. Pletina metélica para adaptación del imán.

Para la realización de las pruebas es necesario fijar el tornillo micrométrico junto con la jeringuilla en algún tipo de soporte. Para ello se ha de tener en cuenta que el émbolo del tornillo micrométrico describe un movimiento de rotación a medida que se va desplazando longitudinalmente. Dichos movimientos se van a trasladar a cualquier sólido que se mueva solidariamente a él, por este motivo el conjunto del sistema posterior al imán debe tener menos

grados de libertad. De hecho, solamente el émbolo de la jeringuilla y la pletina metálica que sirve de acople mantendrán un grado de libertad, el longitudinal. El cuerpo de la jeringuilla en sí debe permanecer inmóvil. En las siguientes figuras se puede observar el montaje del prototipo B de sistema de aspiración, así como las restricciones de los grados de libertad mencionadas con anterioridad.

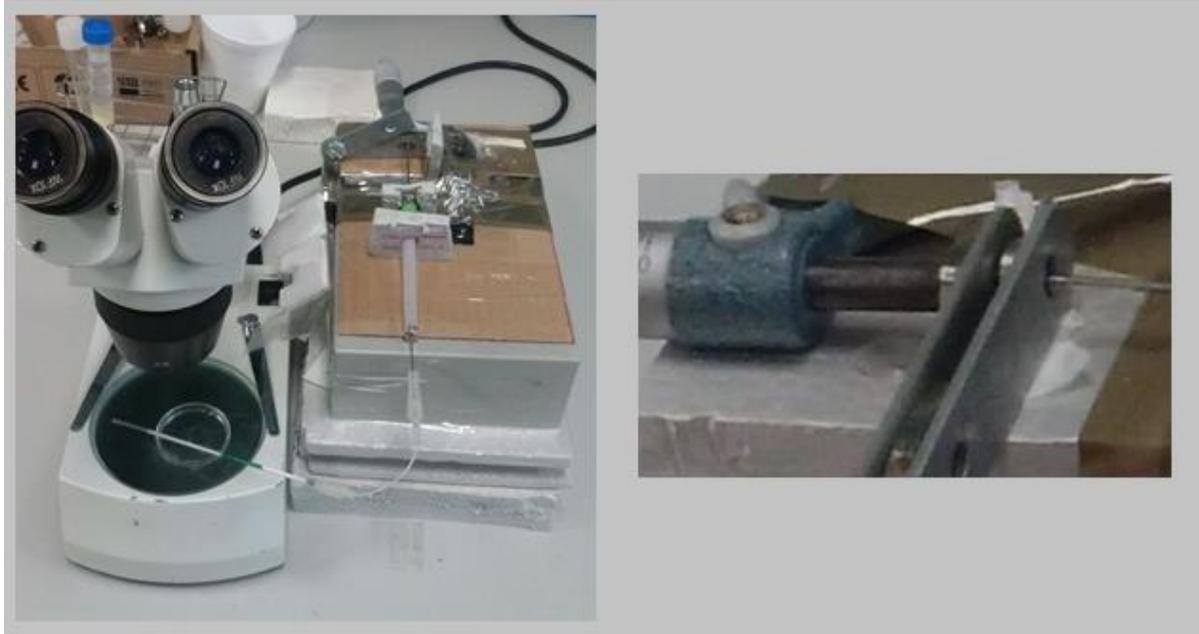


Figura 4-18. Sistema de aspiración. Prototipo B.

Este segundo prototipo está constituido por:

- Tornillo micrométrico con 3 *cm* de longitud máxima medible.
- Jeringuilla de cristal, cuyo émbolo es metálico, de 100 μ l (este modelo tiene una terminación en forma de aguja metálica que no es extraíble, por lo que habrá que adaptar los conectores a la misma)
- Conectores
- Tubo capilar de: $\phi_{inner} = 0.5588 \text{ mm}$, $\phi_{outer} = 1.0668 \text{ mm}$ y una longitud de 12 *cm*.

❖ ENSAYO

En esta ocasión, el movimiento del émbolo de la jeringuilla se consigue haciendo girar el tornillo micrométrico, por lo que con una mano se irá regulando dicho tornillo mientras que con la otra se manipulará el SafeSpeed. Es importante tener presente que antes de iniciar el ensayo, por los mismos motivos expuestos en el experimento anterior, se debe situar el émbolo del tornillo micrométrico a mitad de carrera, es decir, a 1.5 *cm*.

El ensayo consiste en introducir el capilar en la solución de vitrificación y tratar de controlar la interfase aire-líquido, el objetivo es situarla entre la segunda y tercera marca de seguridad. Para ello será necesario adelantar o retrasar el émbolo de la jeringuilla haciendo girar en uno u otro sentido el tornillo micrométrico.

❖ RESULTADOS

Bajo el microscopio, lo primero que se observa es que debido a la capilaridad una mínima cantidad de solución de vitrificación penetra en el capilar. Una vez que la interfase aire-líquido se frena y se está en disposición de empezar a retraer el émbolo, con el objetivo de provocar el avance de dicha interfase. El comportamiento ideal que se está buscando consiste en que la interfase avance a la par que el émbolo y si este se para que la interfase también lo haga. Pero *¿qué ocurre realmente?*

El primer problema con el que nos encontramos es que es un ensayo muy lento dado que los tiempos, *estímulo – respuesta*, no son instantáneos. Es decir, en el instante en que empieza a girar el tornillo micrométrico para retraer el émbolo no se aprecia ninguna alteración en la interfase, esta permanece inmóvil en el punto en el que se encuentra. Pasados unos segundos se observa que la interfase inicia su movimiento y comienza a ascender por el capilar, pero cuando llega al punto deseado e intuitivamente se deja de girar el tornillo micrométrico, esta no se frena y continúa su ascenso. Con el objetivo de constarrestar esa inercia que posee se plantea realizar el ensayo de forma que, cuando se alcance la posición deseada, se cambie el sentido de giro del tornillo para que el émbolo obligue al aire a contraerse, genere mayor presión y frene el avance de la solución de vitrificación. De este modo se entra en un ciclo de ajuste, girando el tornillo en ambos sentidos hasta conseguir fijar la interfase en el punto deseado. Pero, este procedimiento no ofrece buenos resultados porque, como ya se ha referenciado anteriormente, es demasiado lento. Además, se ha de tener presente que el tornillo micrométrico solo tiene una carrera de 3 cm por lo que limita el uso de la carrera del émbolo de la jeringuilla a menos de la mitad de su capacidad de operación.

En definitiva, este prototipo de sistema de aspiración ofrece un procedimiento lento y tedioso. Es cierto que la interfase avanza suavemente pero no se tiene capacidad suficiente de dar repuesta a la inercia que adquiere, lo que degenera en un control pésimo de su posición.

PROTOTIPO C:

En primer lugar, resulta conveniente hacer una pequeña recopilación de los resultados anteriores. Por una parte, con el primer prototipo, se observaba que la interfase adquiría cierta aceleración de modo que no se tenía capacidad visual para frenar la misma a tiempo en la posición deseada, además el mínimo desplazamiento en el émbolo de la jeringuilla desencadenaba un gran desplazamiento de la interfase. Por otra parte, con el segundo prototipo se percibe perfectamente, a través del microscopio, como la solución de vitrificación va penetrando lentamente en el capilar, pero la inercia que adquiere y la falta de mayor velocidad en el émbolo del tornillo micrométrico impiden realizar un buen control en cuanto a nivel de posición.

En esta versión de sistema de aspiración se pretende introducir una pequeña automatización. El montaje en sí es similar al del prototipo C, sólo que en esta ocasión el motor del movimiento será una bomba de jeringa.

El sistema consiste en sustituir el tornillo micrométrico por una bomba de jeringa, manteniendo el resto de elementos intactos. Si bien es cierto que, tal y como se aprecia en la siguiente figura, la bomba de jeringa ya viene diseñada con un soporte para la propia jeringa, de modo que inmoviliza esa parte del sistema sin necesidad de fijarla a otro soporte auxiliar.



Figura 4-19. Sistema de aspiración. Prototipo C. Bomba de jeringa

La bomba de jeringa de la figura superior cumple dos requisitos indispensables: por una parte, tiene capacidad de avance y retroceso, es decir se puede desplazar el émbolo de la jeringuilla en los dos sentidos y, a diferencia del tornillo micrométrico, con la bomba de jeringa se puede aprovechar toda la carrera del émbolo de la jeringa; por otra parte, se puede controlar la velocidad a la que se realiza dicho movimiento.

❖ ENSAYO

Siguiendo el procedimiento del ensayo anterior, se pone en marcha la bomba de jeringa y regulando la velocidad del émbolo, así como la dirección de avance, se trata de controlar la interfase aire-líquido.

❖ RESULTADOS

El control de la prenetación de la solución de vitrificación en el capilar del SafeSpeed es similar al del punto anterior.

En esta ocasión, también se aprecia que la respuesta del fluido al movimiento del émbolo es tardía. Si bien es cierto, que la capacidad para contrarrestar dicha inercia ha aumentado pues la bomba de jeringa permite aumentar la velocidad de avance del émbolo en mayor medida que lo permitía el tornillo micrométrico. No obstante, al igual que en el caso anterior, si el objetivo es por ejemplo situar la interfase en la tercera marca negra resulta complicado conseguirlo a la primera. Es necesario entrar en un ciclo de avance y retroceso entorno al punto en que se quiere posicionar la interfase, a medida que se trata de reducir la velocidad de la misma hasta conseguir frenarla.

Otro aspecto a destacar es que si la bomba de jeringa hubiese resultado fructífera hubiese sido necesario realizar algún tipo de adaptación para su manipulación puesto que la vista es necesario focalizarla, en todo momento, en el óvulo que se quiere criopreservar.

Una vez finalizados todos los ensayos correspondientes a este primer experimento se va a proceder a realizar un análisis global de los mismos.

Los prototipos analizados hasta el momento se han basado en que para impulsar el movimiento de la interfase aire-líquido, o el futuro óvulo si el sistema llegase a implantarse en un laboratorio, se haga uso del émbolo presente en cualquier tipo de jeringuilla.

El émbolo no ha resultado ser un buen promotor del movimiento en el sistema de aspiración. Si la jeringuilla tiene un volumen alto entonces pequeños desplazamientos del mismo generan grandes desplazamientos de la interfase y a gran velocidad, mientras que si se emplean jeringuillas de pequeño volumen el tiempo que transcurre entre que se inicia el movimiento del émbolo y la interfase comienza su movimiento es muy elevado, en esta situación la interfase adquiere mucha inercia.

De los prototipos ensayados el único medianamente plausible es el A, pero como ya se ha concretado en ese punto en vez de realizar movimientos longitudinales del émbolo, sería necesario impulsarlo lateralmente de forma suave para generar las variaciones de presión en el interior del conducto por el ligero movimiento de la goma aislante que lleva en el extremo. Practicando durante un cierto periodo de tiempo esta técnica resulta sencilla, sin embargo, el control de la interfase es muy similar al alcanzado con el sistema de boca.

4.4.2 Experimento 2: Basado en el Bulbo

En este segundo experimento, el sistema encargado del movimiento de la interfase será un bulbo como el que se muestra en la siguiente figura:



Figura 4-20. Bulbo o perilla.

El bulbo en sí mismo constituye un sistema completo de aspiración, pues se puede acoplar directamente al extremo del SafeSpeed tal y como se muestra en la siguiente imagen:



Figura 4-21. Bulbo como sistema de aspiración. [13]

En este sistema el control del movimiento de la interfase se ejecuta regulando la presión que se transfiere al bulbo. Los resultados que se obtienen a nivel de control de posición y velocidad de la interfase son muy buenos, pero tal y como está diseñado, su manipulación se puede asimilar al hecho de tratar de escribir con un bolígrafo sujetándolo por el extremo opuesto a la punta, el nivel de precisión en el capilar del SafeSpeed es mínimo porque al presionar el bulbo se transfieren ciertas vibraciones a la pajueta.

La inestabilidad inherente a este sistema ha hecho que caiga en desuso, pero *¿Se podría eliminar dicha inestabilidad manteniendo la precisión de control de la interfase que proporciona?*

PROTOTIPO D:

Las vibraciones en el capilar son debidas a que el bulbo se conecta directamente al SafeSpeed, por lo que para eliminarlas se decide ampliar el sistema con un tubo capilar de modo que con una mano se manipule el SafeSpeed y con la otra el bulbo.

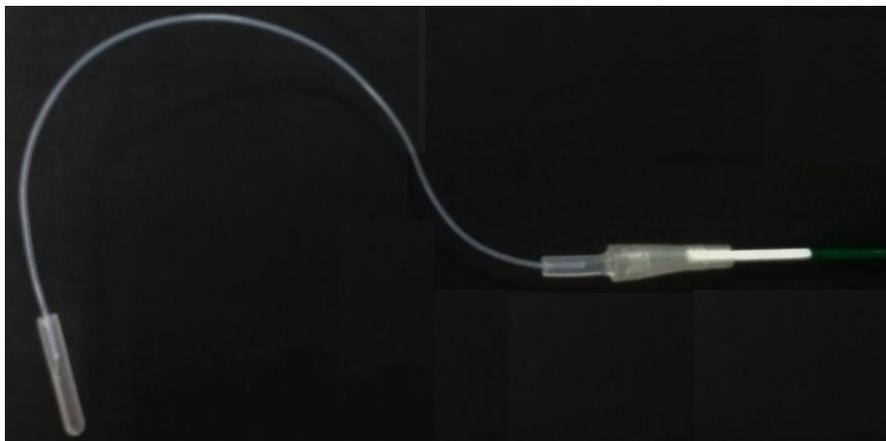


Figura 4-22. Sistema de aspiración. Prototipo D.

Los componentes principales de este prototipo de sistema de aspiración son:

- Bulbo
- Conectores
- Tubo capilar de: $\phi_{inner} = 0.5588 \text{ mm}$, $\phi_{outer} = 1.0668 \text{ mm}$ y una longitud de 24 cm.

❖ ENSAYO

En esta ocasión, en el instante en que se pone en contacto el capilar con la solución de vitrificación es necesario presionar ligeramente el bulbo, hasta que a través del microscopio se aprecie la formación de una pequeña burbuja de aire en la placa petri que contiene la solución. A continuación, regulando la presión que se ejerce con la llima de los dedos sobre el bulbo ya se puede iniciar el control del movimiento de la interfase.

❖ RESULTADOS

En la primera toma de contacto con este sistema ya se aprecian unos resultados extraordinariamente mejores a los de los dispositivos anteriores.

Ejerciendo mayor o menor presión sobre el bulbo se consigue adecuar fácilmente la velocidad de ascensión de la solución de vitrificación por el capilar. Además, una vez alcanzado el punto deseado, basta con mantener la presión que se tiene en ese instante sobre el bulbo para que la interfase aire-líquido no se mueva.

En definitiva, es un procedimiento sencillo y rápido para el que no es necesario un largo periodo de adaptación, basta con realizar un par de ensayos para conseguir tener una técnica casi perfecta.

Este segundo experimento en el que se ha desarrollado un prototipo de sistema de aspiración basado en un bulbo ha aportado muy buenos resultados, pues se ha conseguido un sistema sencillo que mejora el control de la interfase, tanto en posición como en velocidad, con respecto a los sistemas empleados actualmente. Además, a diferencia del sistema de boca, es un sistema cerrado por lo que no es necesario emplear filtros para reducir la exposición a la contaminación de la muestra. Puesto que es el prototipo que mejores expectativas ha creado se va a profundizar un poco más en su configuración y analizar su uso dentro del proceso completo de criopreservación, dado que hasta el momento sólo se ha analizado como afecta su uso al control de la interfase.

5 SISTEMA DE ASPIRACIÓN ÓPTIMO

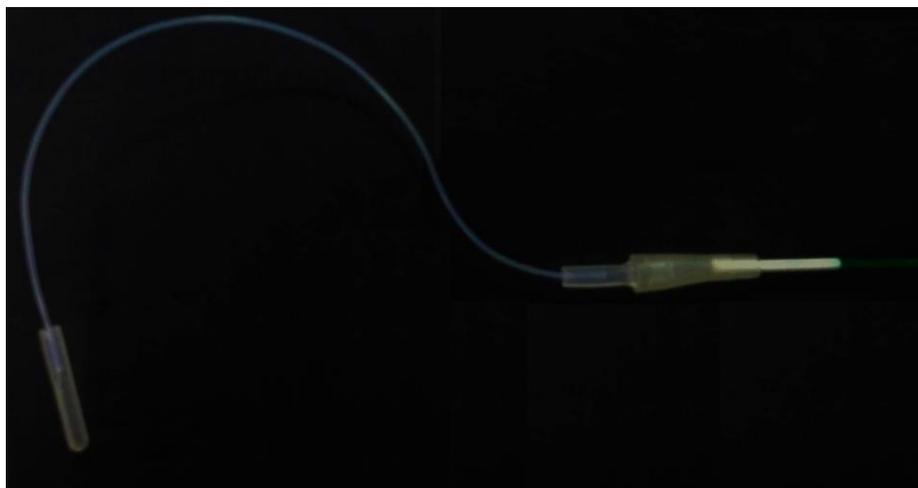


Figura 5-1. Sistema de aspiración óptimo.

5.1 Principio de funcionamiento.

El objetivo de cualquier sistema de aspiración es facilitar la carga y descarga del SafeSpeed. En el caso que nos ocupa, el dispositivo está dotado de una perilla que permite regular la presión del aire contenido en el interior del sistema y poder así introducir o expulsar el oocito correspondiente. Es un sistema completamente manual, es decir, el nivel de presión ejercido en el bulbo está determinado por la sensibilidad de la llema de los dedos junto con la percepción visual del avance de la entrefase.

Para cargar el SafeSpeed es necesario presionar ligeramente el bulbo, expulsar una burbuja de aire y, a continuación, disminuir ligeramente la presión hasta alcanzar la posición deseada, llegados a ese punto es necesario mantener la presión del bulbo hasta la realización del sellado. Por el contrario, la intuición nos dice que debería ser suficiente con presionar ligeramente el bulbo, sin embargo, como se verá a continuación será necesario modificar ligeramente el sistema para que la expulsión del oocito resulte exitosa.

5.2 Configuración.

A estas alturas del proyecto, una de las primeras preguntas que se nos puede pasar por la mente es la siguiente: *¿Cómo se construye el sistema de aspiración?*

Aunque en el punto anterior, al hablar de este prototipo ya se hizo referencia a los elementos que lo conforman, será ahora cuando se profundice un poco más en las características de dichos elementos y también se describirá como se debe llevar a cabo el acople de los mismos para que el sistema funcione con el éxito esperado.

El elemento más importante, sin lugar a dudas, de todo el sistema de aspiración es el bulbo.

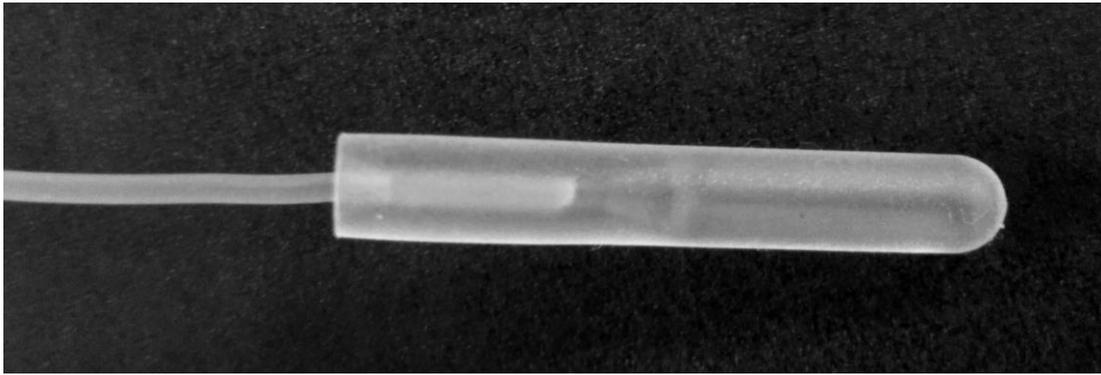


Figura 5-2. Conexión Bulbo – Tubo capilar.

A la vista de la imagen, se podría describir la estructura interna del bulbo como una pequeña cámara de aire seguida de una zona troncocónica que desemboca en un conducto de menor sección. Es importante introducir el tubo capilar hasta el punto en el que se inicia la sección troncocónica.

Dicho tubo capilar tiene las siguientes dimensiones: $\phi_{inner} = 0.5588 \text{ mm}$, $\phi_{outer} = 1.0668 \text{ mm}$ y una longitud de 24 cm . Se ha acotado la longitud a 24 cm porque dado que con una mano se maneja el bulbo y con la otra la pajuela es necesario tener cierto rango de maniobrabilidad, evidentemente a menor distancia mejor es el control de la interfase, pero se pierde confortabilidad a la hora de realizar el proceso.

El siguiente paso es diseñar un preconector para poder acoplar el tubo capilar al propio conector del SafeSpeed.



Figura 5-3. Conexión Tubo capilar – Conector.

Se cogen dos bulbos de las mismas características que el bulbo principal y se le realizan dos cortes de modo que el aire pueda fluir a través de ellos. Acotando desde el orificio de entrada que traen por diseño se corta a 1.7 cm uno de los bulbos y a 0.8 cm el otro. En la imagen superior se puede intuir como el corte del bulbo de mayor tamaño coincide con la sección media de la cámara de aire, mientras que al más pequeño el corte se le ha practicado en mitad de la sección troncocónica. La unión de ambos trozos de bulbo se lleva a cabo de forma que las secciones troncocónicas formen una pequeña cámara de aire interna. A continuación, el tubo capilar se introduce en el trozo de bulbo de mayor tamaño hasta el principio de la cámara y, a su vez, este preconector se introduce en el conector 0.6 cm .

Es importante que todo el sistema esté sellado correctamente para que no se produzca ninguna fuga de aire, para ello se debe comprobar que el pegamento empleado haya ensamblado correctamente todos los elementos.

Una vez diseñado y confeccionado el sistema de aspiración se dispone el laboratorio para realizar una prueba completa del mismo.

❖ ENSAYO

La prueba consiste en realizar una carga del SafeSpeed, realizar el sellado del mismo y, a continuación, proceder a la descarga. Dado que no se dispone de material biológico será suficiente realizar la prueba únicamente con la solución de vitrificación.

❖ RESULTADOS

La carga de la pajuela, que es lo que se había ensayado hasta el momento ofrece muy buenos resultados, se caracteriza por ser rápida y sencilla. Pero, paradójicamente, en la descarga nos encontramos con un problema que hasta el momento no se había considerado.

Al cortar el sellado de la parte posterior del SafeSpeed e introducirlo en el sistema de aspiración tiene lugar una sobrepresión en el circuito que provoca la expulsión directa de la solución de vitrificación en el momento en que se corta el sellado del capilar para liberar el oocito. Aunque se practique primero el corte de ambos sellados y a posteriori se conecte el sistema de aspiración sigue habiendo una sobrepresión que hace que la solución abandone el capilar por sí sola.

¿Cómo solucionar el problema de la descarga del SafeSpeed?

Está claro, por los resultados observados, que el sistema de aspiración actual funciona perfectamente a la hora de realizar la carga de la pajuela por lo que se plantea aislar los sistemas, es decir, realizar la carga con este sistema y para la descarga pensar en alguna variante del mismo.

El problema al que nos enfrentamos es que a la hora de realizar la conexión del SafeSpeed con el sistema de aspiración tiene lugar una sobrepresión en el interior del sistema por lo que la solución más inmediata reside en buscar el modo de liberar presión.

Incorporación al sistema de una llave de tres vías.

La llave de tres vías es un dispositivo lo suficientemente ligero para no aportar peso al sistema manteniendo la confortabilidad del mismo y será el mecanismo ideal para liberar la presión que se genera tras la conexión.

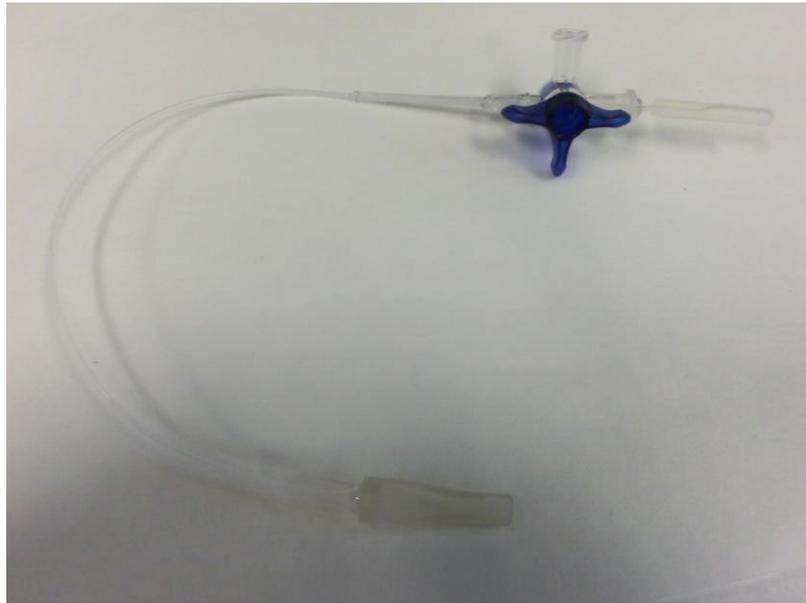


Figura 5-4. Sistema de aspiración óptimo para la descarga.

Tal y como puede observarse en la figura superior la llave de tres vías se instalará a continuación del bulbo para que el mínimo peso que pueda aportar al sistema no interfiera en la manipulación del SafeSpeed.

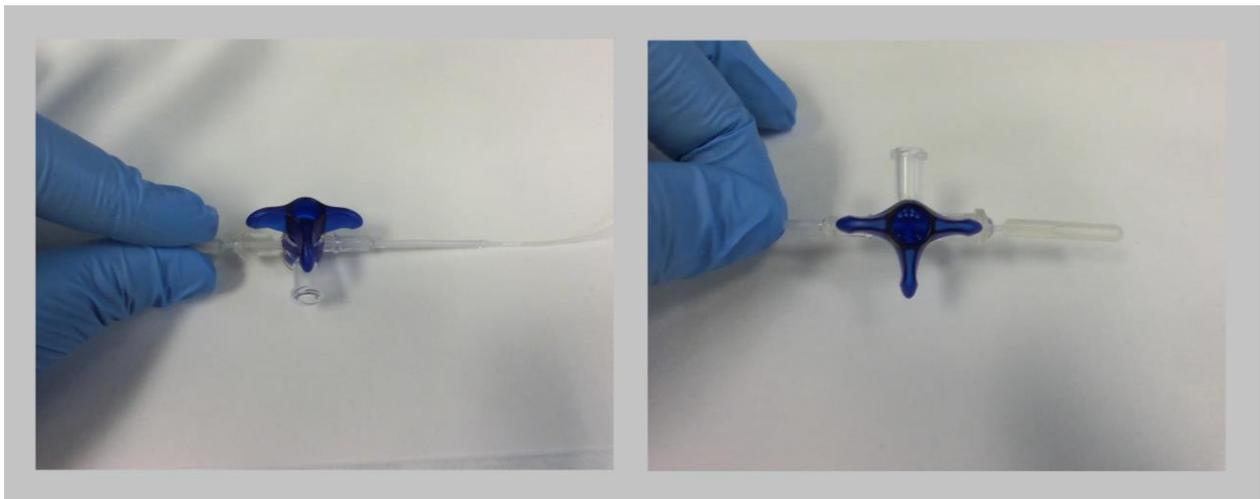


Figura 5-5. Llave de tres vías.

A la hora de realizar la prueba es necesario seguir las siguientes pautas:

- Situar la válvula en la posición que se indica en la imagen superior a la izquierda, con el objetivo de que al conectar el dispositivo a la pajuela no se genere ninguna sobrepresión.
- Cortar el sellado de la zona posterior del SafeSpeed y conectarlo al sistema de aspiración.
- Girar la llave hasta la posición que se muestra en la imagen superior a la derecha, cortar el sellado del capilar y, presionando ligeramente el bulbo, iniciar la descarga.

Tras esta pequeña modificación del sistema se han realizado sucesivas pruebas en el laboratorio y los resultados han sido satisfactorios, por lo que se puso el sistema en disposición de los facultativos para que realizasen las pruebas pertinentes en sus laboratorios.

6 DESARROLLO FUTURO: AUTOMATIZACIÓN

En el punto anterior se ha descrito un sistema de aspiración que cumple con las necesidades requeridas hasta el momento pero que es completamente manual. Esto, a priori, no supone ningún problema pues los dispositivos empleados hasta la fecha son de estas características; pero, no deja de ser verdad, que una pequeña automatización del proceso podría facilitar la labor de los embriólogos.

El proceso de carga y descarga del SafeSpeed se puede realizar perfectamente con este sistema de aspiración, pero hay dos puntos que se podrían mejorar. Por una parte, dado que con una mano se maneja el SafeSpeed y con la otra el bulbo, a diferencia del sistema de boca no se dispone de una mano libre para manipular directamente otros dispositivos como puede ser desplazar la placa petri para centrarla en el microscopio. Por otra parte, con este sistema una vez que se posiciona el oocito en el capilar es necesario mantener la presión que se está ejerciendo sobre el bulbo hasta que se produce el sellado del capilar, esto no es complicado, pero si es cierto que si por algún motivo se presionase el bulbo excesivamente el óvulo saldría despedido hacia el exterior. No obstante, si el sellado se lleva a cabo con la selladora automática este proceso es bastante sencillo.

¿Cómo se podría automatizar el sistema de aspiración?

Una de las vías de automatización del sistema consiste en automatizar el bulbo, es decir, en vez de ejercer la presión con las llemas de los dedos diseñar un dispositivo que ejerciera dicha labor. Este proceso de automatización aún se encuentra en vías de desarrollo, no obstante, se van a introducir en este documento las líneas de investigación que se están siguiendo.

El dispositivo consistiría en diseñar una pieza de sujeción para el bulbo mientras que con ayuda de un motor paso a paso otra pieza diferente ejerciera la presión sobre el bulbo, simulando la llema de los dedos. Todo ello acompañado del Hardware y Software necesario para controlar el avance o retroceso del motor y, en consecuencia, la presión ejercida.

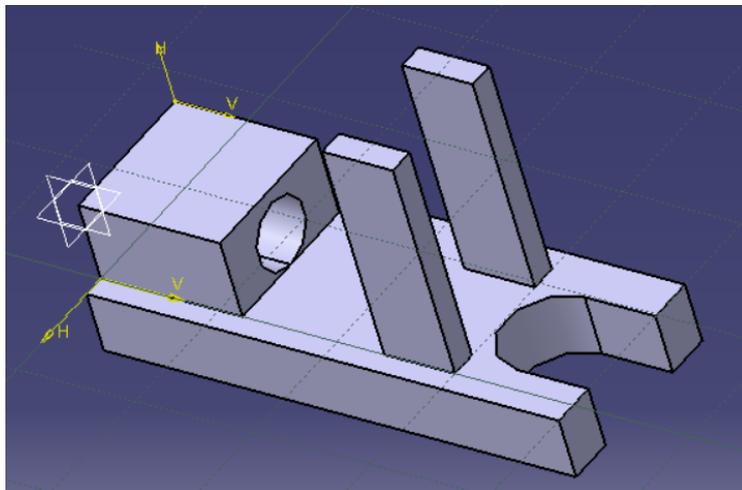


Figura 6-1. Pieza de sujeción del bulbo y anclaje del motor paso a paso.

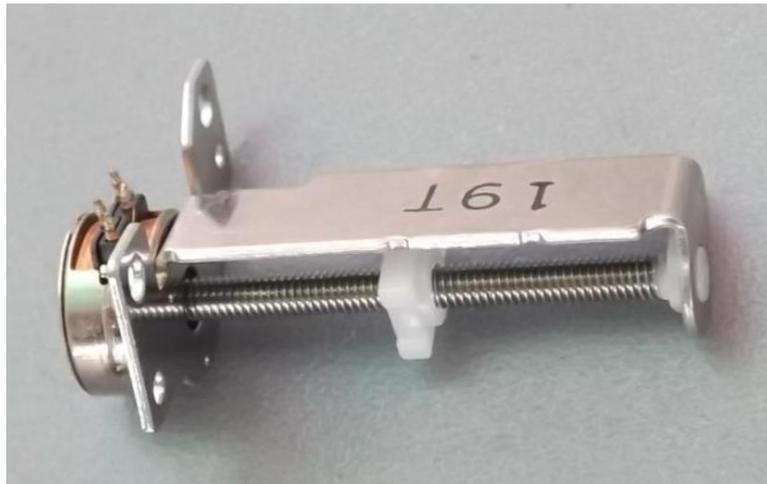


Figura 6-2. Ejemplo de motor paso a paso.

Las figuras anteriores son un ejemplo de los elementos que constituirían la automatización del bulbo. No obstante, al igual que ocurrió con la bomba de jeringa, automatizar el bulbo no garantiza que se alcance la misma sensibilidad y nivel de precisión que con las llemas de los dedos.

Otra de las líneas de investigación consistiría en acoplar un motor a la llave de tres vías con el objetivo de poder abrir y cerrarla a través de un pulsador que se pudiese accionar, por ejemplo, con el pie. *¿Qué beneficios supondría?*

Manualmente se ha comprobado que si se emplea el sistema de aspiración con la llave de tres vías para cargar el SafeSpeed es posible, una vez situada la entrefase en la posición correcta, cerrar la llave de tres vías para confinar el aire entre la entrefase y la propia válvula de modo que la presión que se ejerza en el bulbo no afecte a esa zona del conducto. De este modo, ya no sería necesario mantener el bulbo presionado hasta realizar el proceso de sellado y por supuesto, aunque se presionase por error el bulbo, el oocito no saldría despedido.

¿Se podría emplear una válvula automática?

A diferencia de la llave de tres vías, que lo único que hace es cortar el paso del aire, las válvulas automáticas suelen cortar el paso del aire ejerciendo presión por lo que se podría estar reproduciendo el mecanismo del bulbo e inducir una mínima presión que fuese suficiente para desplazar el oocito.

El proceso de automatización del sistema de aspiración se encuentra en vías de desarrollo y posiblemente pronto se consigan buenos resultados. Así mismo, el culmen definitivo sería llevar a cabo la automatización de todo el proceso incluida la detección automática del posicionamiento del oocito en el interior del capilar del SafeSpeed.

CONCLUSIÓN

El sistema de aspiración constituye una mínima parte, pero no por ello menos importante, de todo un gran proceso de criopreservación.

Al igual que en todo proyecto fue necesaria una primera etapa de investigación y toma de contacto con el tema a tratar. Los primeros días de laboratorio se convirtieron en horas de ensayos con los métodos usuales empleados hoy en día para la carga y descarga del SafeSpeed, sólo así se podía llegar a entender en que consistía el proceso y que aspectos se pretendían mejorar de este.

Una vez perfeccionada la técnica ya se estuvo en disposición de dar un paso más y poder abrir diferentes líneas de investigación. Por una parte, se destaca el uso del émbolo de la jeringuilla como herramienta propulsora del movimiento de la entrefase mientras que, por otra parte, sería un bulbo el dispositivo empleado para tal fin. Tras la realización de numerosos ensayos en el laboratorio se concluye que el sistema de aspiración dotado de un bulbo ofrece muy buenos resultados, pues se consigue un dominio perfecto del movimiento de la entrefase.

A estas alturas, ya se había cubierto uno de los objetivos planteados al principio del proyecto que consistía en diseñar un sistema de aspiración que mejorase el control del movimiento de la entrefase durante la carga del SafeSpeed. A partir de aquí, todos los esfuerzos se centraron en optimizar este sistema para poder realizar todo el proceso de carga y descarga de la pajuela incluyendo la fase de sellado. Entonces se apreció que, durante la descarga, tal y como estaba configurado el sistema la solución de vitrificación era expulsada del capilar inmediatamente después de la eliminación del sellado. Esto se debía a que, al ser un sistema cerrado, al conectarlo a la pajuela se generaba una mínima sobrepresión, la cuál se consiguió eliminar con la incorporación al dispositivo de una llave de tres vías.

Finalmente, se han hecho un par de apreciaciones sobre la posible automatización del sistema de aspiración, trabajo que se encuentra actualmente en vías de desarrollo. El objetivo final es la automatización de todo el proceso, diseñar una máquina capaz de cargar el óvulo en el SafeSpeed y realizar los respectivos sellados del mismo.

ANEXO A

En este anexo se hará referencia a los materiales empleados en la construcción del sistema de aspiración.

- Tubo capilar:

Microbore PTFE Tubing, 0.022"ID x 0.042"OD, 100 ft/roll. Por si fuese necesario a continuación se muestran las características técnicas de este material, no obstante, para su misión en el sistema de aspiración, a parte de las propias dimensiones, sólo interesaba que el material no se plegase con facilidad para evitar obstrucciones al paso del aire.

Specifications	
Product Type	Tubing
Working pressure (psi)	4000
Maximum temperature (° F)	500
Minimum temperature (° F)	-400
Tubing ID (in.)	0.022
Tubing OD (in.)	0.042
Wall thickness (in.)	0.01
Max psi	4000
Certifications	FDA-Compliant,USP
FDA Compliant	Yes
USP Compliant	Yes
Translucent	Yes
Color	Translucent
Feet per pack	100
Tubing formulation	PTFE
Qty/ea	1
Brand	Cole-Parmer

Figura Anexo: A-1. Características del tubo capilar

- Bulbos de silicona:



Figura Anexo: A-2. Referencia del bulbo.

- Conectores:

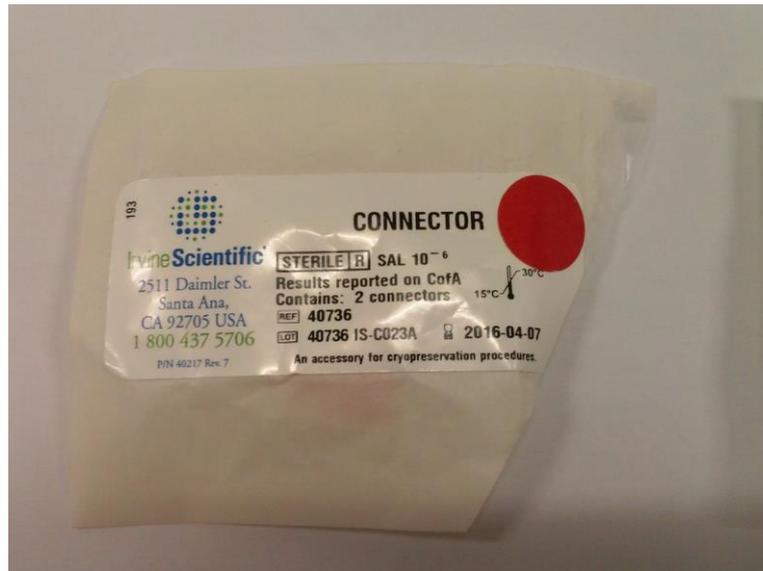


Figura Anexo: A-3. Referencia del conector.

- Pegamentos:



Figura Anexo: A-4. Referencia del pegamento.

ANEXO B

La redacción de este documento se ha complementado con un vídeo descriptivo del proceso de carga y descarga del SafeSpeed, en este anexo se muestran las secuencias más significativas.



Figura Anexo: B-1. Secuencia 1.



Figura Anexo: B-2. Secuencia 2.



Figura Anexo: B-3. Secuencia 3.



Figura Anexo: B-4. Secuencia 4.



Figura Anexo: B-5. Secuencia 5.

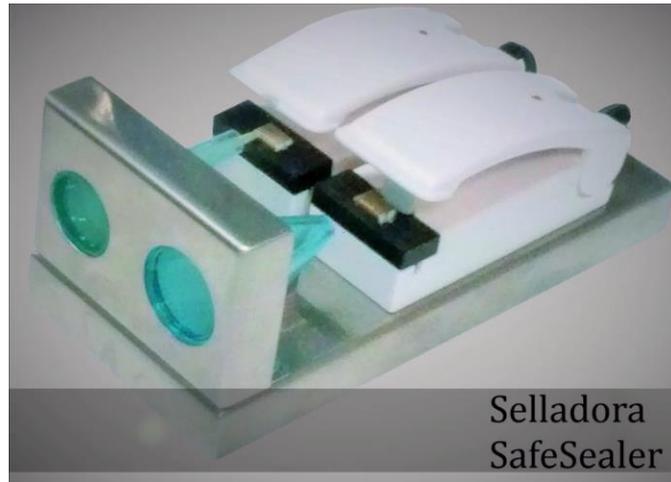


Figura Anexo: B-6. Secuencia 6.



Figura Anexo: B-7. Secuencia 7.



Figura Anexo: B-8. Secuencia 8.

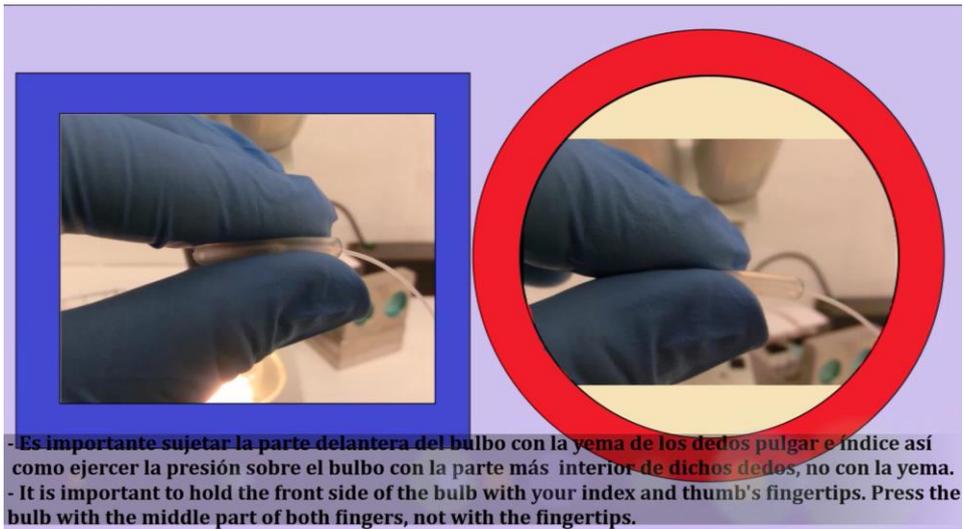


Figura Anexo: B-9. Secuencia 9.



Figura Anexo: B-10. Secuencia 10.



Figura Anexo: B-11. Secuencia 11.

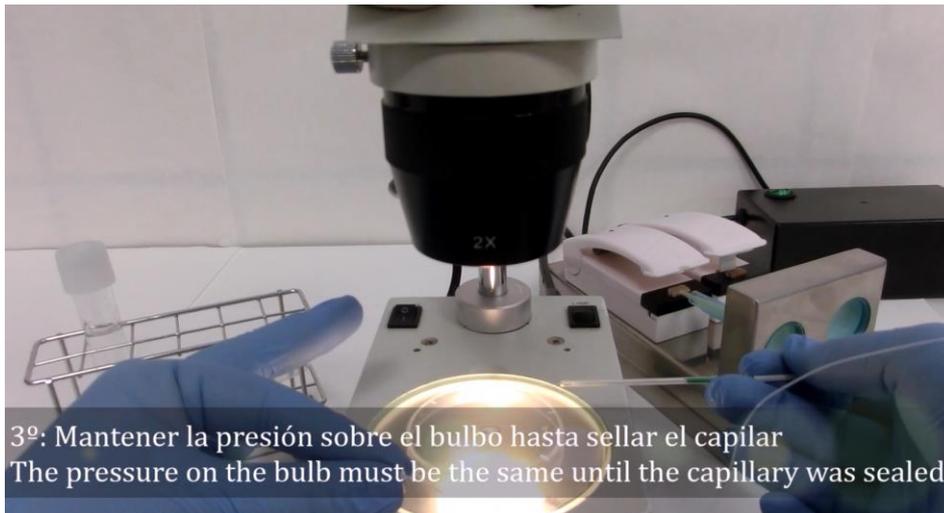


Figura Anexo: B-12. Secuencia 11.



Figura Anexo: B-13. Secuencia 13.

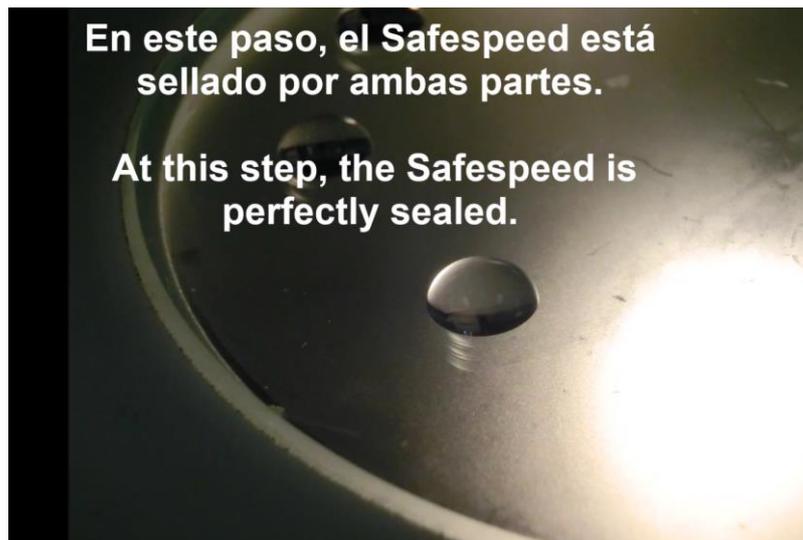


Figura Anexo: B-14. Secuencia 14.

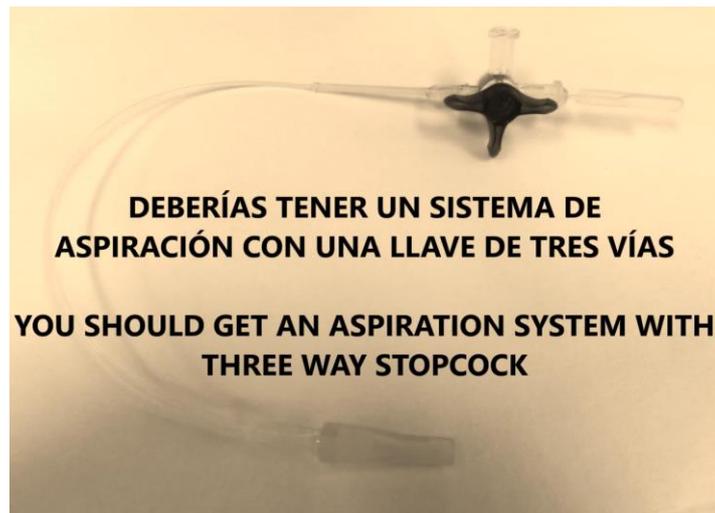


Figura Anexo: B-15. Secuencia 15.

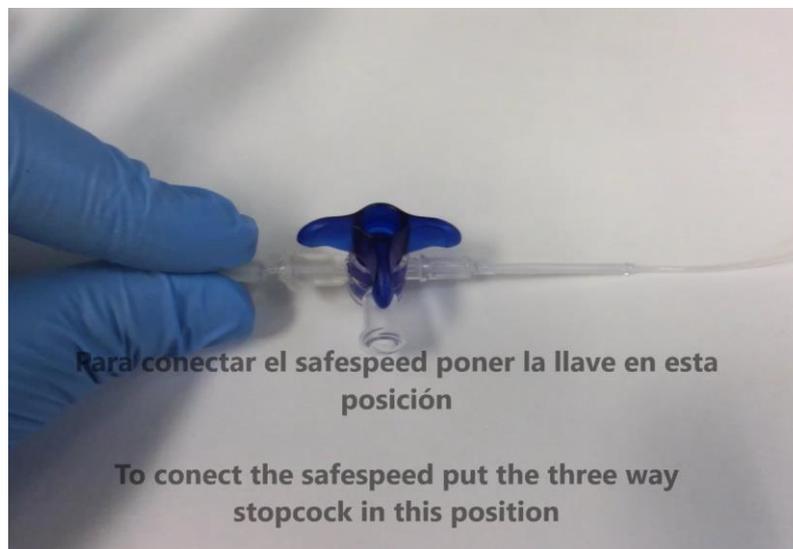


Figura Anexo: B-16. Secuencia 16.



Figura Anexo: B-17. Secuencia 17.

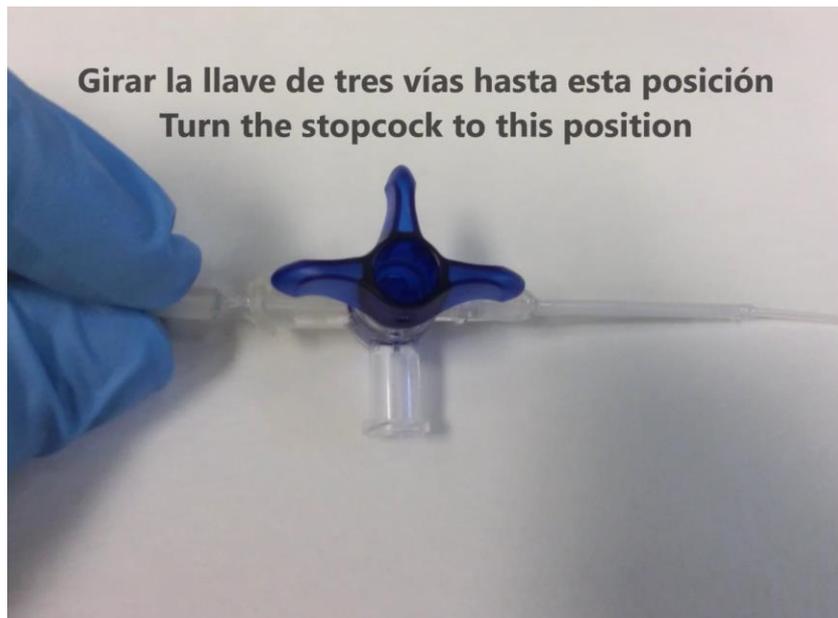


Figura Anexo: B-18. Secuencia 18.



Figura Anexo: B-19. Secuencia 19.

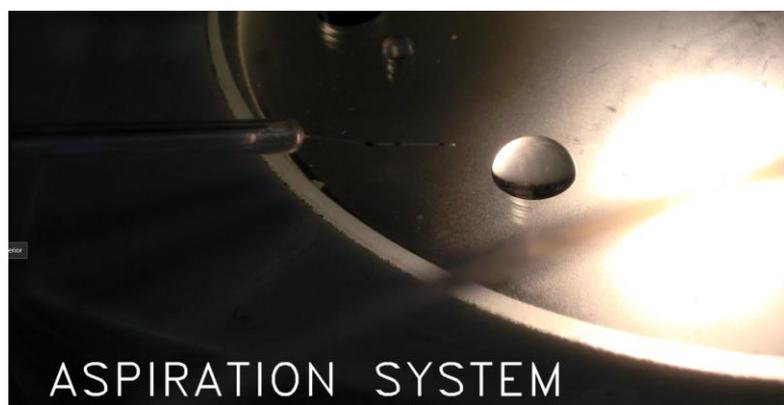


Figura Anexo: B-20. Secuencia 17.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Konc J, Cseh S, Kanyó K, Kriston R, Varga E, *Cryopreservation of Oocytes and Embryos in Human Assisted Reproduction*, J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (4), 251-258.
- [2] De Sola Romero M^a Dolores, *Criopreservación de blastocitos de ratón mediante el empleo de microcapilares de policarbonato y velocidades de enfriamiento ultrarápidas usando bajas concentraciones de crioprotector*, TFC, ETSI, Universidad de Sevilla, 2009.
http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C_Rb2121533_SSola%20Romero%2C%20Maria%20Dolores%20de_Orightresult_X4?lang=spi&suite=cobalt
- [3] Leyre Herrero Grassa, *Utilidad de la vitrificación de ovocitos y embriones en la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica*, Tesis Doctoral, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, 2014.
<https://eciencia.urjc.es/bitstream/handle/10115/13341/TESIS%20LEYRE%20HERRERO.pdf;sequence=1>
- [4] A.Borini, R.Sciajno, V.Bianchi, E.Sereni, C.Flamigni and G.Coticchio, *Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration*, Human Reproduction Vol.21, No.2 pp. 512–517, 2006.
- [5] http://www.reprobiotec.com/nitrogeno_liquido_uso.html
- [6] Laura Gil Aliaga, *Vitrificación vs Congelación de óvulos*, reproduccionasistida.org, 2012.
<http://www.reproduccionasistida.org/vitrificacion-vs-congelacion-de-ovulos/>
- [7] Sara Salgado, *Protocolos de Congelación de óvulos*, reproduccionasistida.org, 2016.
<http://www.reproduccionasistida.org/congelacion-de-ovulos/>
- [8] <http://laplace.us.es/cryobiotech/>
- [9] Marina S, Marina F, Torres PJ, Fosas N, Martín P, Alcolea R, Pérez N, Fernández S, Arnedo N, Jové I, Hochman M, Suñol J. , *Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión*, Revista Iberoamericana de fertilidad, Vol. 19 - nº 1 pp. 59-68 Enero-Febrero 2002
<http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert-En-Febr02-Trabajo5.pdf>
- [10] Miguel Gallardo, María Hebles, Beatriz Migueles, Mónica Dorado, Laura Aguilera, Mercedes González, Paloma Piqueras, Lorena Montero, Pascual Sánchez-Martín, PhD, Fernando Sánchez-Martín, Ramón Risco, *Thermal and clinical performance of a closed device designed for human oocyte vitrification based on the optimization of the warming rate*, Cryobiology 2016 Aug;73(1):40-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.06.001. Epub 2016 Jun 13.
- [11] Ramon Risco, Heidi Elmoazzen, Marshal Doughty, Xiaoming He, Mehmet Toner, *Thermal performance of quartz capillaries for vitrification*, Cryobiology 55 (2007) 222–229
- [12] RBM online- Vol 12. No 5. 2006 523 *Reproductive BioMedicine Online*;
[http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)61175-3/pdf](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)61175-3/pdf)
- [13] <http://safepreservation.com/en/>
- [14] <http://cryotech-japan.jp/>
- [15] <http://twivf.blogspot.com.es/2011/11/kitazato-vitrification.html>
- [16] <http://www.kitazato-dibimed.com/vitrification-cryotop/cryotop-closed-system/>

[17] <http://www.cryotechlab.com/index.html>

[18] <http://www.gynemed.de/>

[19] https://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page

