

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

***Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida***

**Uso de Microfluidos en Reproducción
Asistida**

Autor: Javier García Fernández

Tutora: María Gaytan Muñoz

Villaviciosa de Odón, Octubre 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
3. INTRODUCCIÓN:
 - 3.1. INTRODUCCIÓN A LOS MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIOS
 - a. MEDIOS DE CULTIVO EN EMBRIONES
 - b. CULTIVO EN EMBRIONES
 - i. CULTIVO SECUENCIAL (composición, ventajas y desventajas)
 - ii. MEDIO ÚNICO (composición, ventajas y desventajas)
 - iii. COCULTIVO (composición, ventajas y desventajas)
 - iv. ALTERNATIVAS DE CULTIVO EMBRIONARIO
 - 3.2. MICROFLUIDOS
 - a. QUE SON LOS MICROFLUIDOS
 - b. HISTORIA DE LOS MICROFLUIDOS
 - c. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS
 - d. INTRODUCCION A LOS MICROFLUIDOS EN EMBRIOLOGIA
4. MATERIAL Y METODOS
5. RECOPIACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL
6. CONCLUSIONES
7. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN/ ABSTRACT

RESUMEN:

El cultivo de embriones y su mejora supone una de las principales vías de investigación activas en el campo de la reproducción humana asistida (RHA). A pesar de la gran cantidad de técnicas y medios de cultivo existentes, los esfuerzos siguen centrados en mejorar el desarrollo embrionario, la tasa de llegada a blastocisto y la tasa de éxito en los tratamientos de FIV. En la última década, se han propuesto diversas alternativas de cultivo embrionario. Con el avance del uso de los fluidos a microescala, los dispositivos microfluídicos han cobrado gran importancia en todos los campos de la biología incluido en la reproducción. Los microfluidos tienen diversas aplicaciones biotecnológicas como el análisis bioquímico, monitorización, secuenciación, encapsulamiento de sustancias, ingeniería de tejidos o automatización de procesos rutinarios del laboratorio como la selección espermática o el ICSI.

El presente trabajo pretende dar una visión actualizada acerca de las últimas evidencias encontradas respecto al uso de los dispositivos microfluídicos en la RHA y sus aplicaciones actuales y futuras en el laboratorio.

Palabras clave: *Embriología; microfluidos; Reproducción asistida; dispositivos microfluidicos;*

ABSTRACT:

Embryo culture improvements constitutes one of the main avenues of active research in the field of assisted human reproduction (AHR). Despite the great variability in the techniques and culture media, main efforts are devoted to improving embryo development, blastocyst arrival rate, and the increase in the success rate in IVF treatments. Over the years, various embryo culture alternatives have been proposed. Due to the development of microscale fluid technology, microfluidic devices have gained great importance in all fields of biology including reproduction. Microfluidic technology has multiple biotechnological applications such as biochemical analysis, monitoring, sequencing, encapsulation of substances, tissue engineering or automation of routine laboratory processes such as sperm selection or ICSI.

The present work provides an updated view on the latest advances in the use of microfluidic devices in AHR as well as on the consideration of its current and future applications in the laboratory.

Key words: *Embryology Microfluids; assisted reproduction; microfluidics devices;*

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Gracias a los avances en las nuevas tecnologías y a los esfuerzos dirigidos a mejorar diariamente los resultados de los tratamientos de reproducción asistida (RA), así como la calidad de los ovocitos y embriones, el estudio de los microfluidos ha adquirido una especial relevancia.

Los microfluidos se han convertido en una de las principales vías de investigación en el cultivo, análisis y selección de gametos y embriones ya que son muy versátiles y fácilmente aplicables. Por ello, su estudio puede suponer un punto de inflexión en la forma de trabajo actual en los laboratorios de FIV.

2.2. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo principal realizar una revisión bibliográfica acerca de los estudios publicados recientemente sobre el uso de microfluidos aplicado a la reproducción asistida, analizando las principales evidencias encontradas al respecto.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar estos objetivos se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Describir los distintos medios y técnicas de cultivo más utilizados en el laboratorio de reproducción humana asistida humana (RHA), y sus principales diferencias en composición y uso.
2. Definir el concepto de microfluidos, y analizar el potencial que estos tienen en reproducción asistida.
3. Analizar su actual uso en RHA, y los principales avances al respecto para su uso futuro.

3. INTRODUCCIÓN

La utilización de medios de cultivos para embriones supone uno de los principales campos de investigación en la medicina reproductiva. Debido al desarrollo de nuevas técnicas y a la mejora en la composición de los medios de cultivo, la fecundación in vitro (FIV) está creciendo de manera exponencial en los últimos años. Sin embargo, las tasas de éxito en la FIV en el ser humano son mucho menores que la alcanzada en otras especies de mamíferos. Esta diferencia puede ser debida, por una parte, a que la composición de los medios de cultivo está definidas a nivel cualitativo y cuantitativo en mamíferos, pero no en humanos. Sin embargo, en cuanto a su composición, todos los medios de cultivo deben incluir una fuente de energía (Glucosa, Lactato o Piruvato), aminoácidos, diferentes macromoléculas biológicas o sintéticas como el BSA, PVA, etc. vitaminas, agentes quelantes, iones, factores de crecimientos, antibióticos y un sistema tampón para mantener el pH estable.

Las diversas patentes y acuerdos comerciales hacen muy difícil la investigación. Por ello, el desarrollo de nuevos medios o técnicas de cultivo alternativas puede suponer un punto de inflexión en el campo de la medicina reproductiva, mejorando aún más las tasas de éxito en el laboratorio de FIV. (Esther Velilla, Silvia Fernández, Mònica Parriego, 2012)

3.1. INTRODUCCIÓN

La evolución en el desarrollo de los medios de cultivo va de la mano de la necesidad de aumentar la tasa de llegada a blastocisto, y como consecuencia el aumento en las tasas de éxito en el tratamiento de FIV. Las condiciones metabólicas del embrión varían a lo largo de su evolución hasta su etapa de blastocisto y se requiere una composición de nutrientes adecuada para cada una de sus fases de desarrollo. Tras la fecundación y durante las primeras divisiones embrionarias, el fluido del oviducto es rico en lactatos y piruvatos y muy pobre en glucosa, sin embargo, a medida que alcanza el estadio de 8 células van aumentando sus necesidades de glucosa, disminuyendo también las necesidades de lactatos y piruvatos. Esta evidencia hace necesario el desarrollo de los medios de cultivo secuenciales (Dorado et al., 2006)

A. MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIO

El desarrollo de los medios de cultivo comenzó en los 80, con el uso de una solución salina junto con una fuente de energía suplementado con aminoácidos adicionales, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos. Posteriormente a principios de los 90, aparecen algunas modificaciones en los medios como la eliminación de la glucosa y fosfato y la inclusión de moléculas como la Taurina, Glutamina o EDTA. Finalmente, a finales de los 90, Gardner y Lave demostraron la importancia de los aminoácidos esenciales y no esenciales y las vitaminas para la fase postcompactación. En la misma época se hicieron cambios importantes en la composición de los medios de cultivo como la modificación del HTF original (Quinn y Pool). Todos los medios de cultivo en embriones ya sean secuenciales, únicos, cocultivo, etc. tienen unos componentes comunes:

- **Glucosa:** Fundamental para mantener la velocidad espermática en el medio de cultivo, así como la división embrionaria. También para asegurar los requerimientos de la ruta de las pentosas fosfato. Sin embargo, los embriones cultivados en presencia de altos niveles glucosa y fosfato parecen presentar una función mitocondrial y capacidad respiratoria reducida que culminaba en la detención del desarrollo, sin embargo, tras la adición de aminoácidos, EDTA o vitaminas al medio de Glucosa + Fosfato, ayudan a prevenir la pérdida de la respiración y mantener con ello una producción de ATP adecuada.
- **Aminoácidos:** Debido a la presencia de sistemas de transporte específicos en ovocitos y embriones, los aminoácidos son metabolizados y absorbidos rápidamente para pasar a formar parte del metabolismo de estos. Dentro de los medios de cultivo, los aminoácidos tienen funciones fundamentales como quelante, buffer de pH, reguladores del metabolismo, precursores biosintéticos, etc. El incremento de aminoácidos no esenciales promueve la formación del blastocelo y el *Hatching*. Por otro lado, los aminoácidos esenciales son necesarios para el desarrollo y la viabilidad de la masa celular interna (MCI).
- **Magnesio:** Debido al aumento en la concentración del calcio intracelular inducido por el cultivo in vitro, debe incorporarse una alta concentración de Magnesio para compensar dicho incremento.
- **Amonio:** La presencia de Amonio en los medios de cultivo puede afectar a la viabilidad del embrión y en consecuencia a la formación del blastocito.

Aminoácidos como la glutamina se descomponen a 37°C para producir amonio y para contrarrestar esta acumulación de amonio, la glutamina ha sido sustituida por Alanil-Glutamina o Glicil-Glutamina.

- **Taurina y EDTA:** Aunque una alta concentración de EDTA puede provocar granulación en el embrión, se usan como protección de la oxidación. También tiene una alta importancia en el desarrollo embrionario, especialmente en la etapa de pre-compactación. En la post-compactación, los embriones cultivados con 10 uM de EDTA reducen el desarrollo de la MCI y el desarrollo fetal post-transferencia (Gardner y Lane, 2000) Por ello la adición de EDTA tras la compactación no está recomendada.
- **Ácido Cítrico:** Fundamental en el desarrollo preimplantatorio debido al ciclo del ácido tricarboxílico

Además, los medios de cultivo deben mantener un pH estable, determinado por la concentración de bicarbonato y CO₂, uso de aceites para cubrir los medios o el uso de tampones como MOPS o HEPES.(Dorado et al., 2006) (Coy, 2012)

B. TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO:

I. MEDIO ÚNICO o CONTINUO (Composición, ventajas e inconvenientes):

El uso de medios continuos permite el cultivo de ovocitos desde su extracción en la punción folicular (D1) hasta su llegada a blastocisto (D5) sin la necesidad de moverlos del incubador. Los medios continuos están basados en proporcionar al embrión los nutrientes necesarios en todas sus fases de desarrollo y que este vaya seleccionando los que necesite en cada momento. Presenta una gran cantidad de metabolitos y nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. (Dunogent et al., 2019) A su vez, presenta la gran ventaja de que el protocolo es menos laborioso al no tener que cambiar el medio en día tres, junto con un menor coste que el cultivo secuencial. Además, diversos estudios sostienen que el medio único es más beneficioso para la protección del desarrollo embrionario y su uso no presenta diferencias significativas en la calidad embrionarias ni en las tasas de blastulación en comparación con el cultivo secuencial. Por otro lado, diversos estudios han asociado el uso de medios únicos con un mayor grado de

granulación en el citoplasma (conocido como *pitting citoplasmático*) de los ovocitos y con ello un aumento en la tasa de abortos, aunque otros estudios al respecto no encuentran una correlación clara entre ambos. (Paz et al., 2017)

II. CULTIVO SECUENCIAL (Composición, ventajas e inconvenientes):

La necesidad de desarrollar medios de cultivo secuenciales surgió a partir de un mejor conocimiento de las necesidades metabólicas del embrión en sus estadíos iniciales. Estos sistemas de cultivo están formados por más de un medio de cultivo y están diseñados para aportar los requerimientos nutricionales y metabólicos específicos en cada estadío del embrión hasta su llegada a blastocisto. Debido a la diferencia de concentraciones y nutrientes de la trompa uterina y del útero, el cultivo secuencial consiste en colocar a los embriones en diferentes medios de cultivo, el primero de ellos, donde se cultivarán los embriones hasta ser transferidos a un segundo medio de cultivo en día 3 (D3) hasta su llegada a blastocisto. Su composición esta bastada en el conocimiento de los nutrientes a los que el embrión está expuesto en la trompa uterina. Entre las principales ventajas que engloban el uso de medios secuenciales como medio de cultivo embrionario podemos destacar algunas como la diferencia de requerimientos nutricionales del embrión en la fase de pre-compactación y post-compactación, el efecto inhibitorio de la EDTA en el desarrollo de la MCI, la acumulación de amonio tras la descomposición de la Glutamina o el rol de los aminoácidos en el desarrollo embrionario (Noriega et al. 2013)(Morbeck et al., 2014)

En cuanto a su composición, el primer medio (hasta día 3) incorpora una baja concentración de glucosa y una alta concentración de piruvato como sustrato energético. Por otro lado, para el segundo medio (Desde día 3 hasta su llegada a blastocisto – día 5 de cultivo-) se incorpora una alta concentración de glucosa. Dentro de las limitaciones que presenta la técnica de cultivo secuencial encontramos un score embrionario significativamente menor respecto al cultivo continuo. Además, presenta una llegada a blastocisto similar al uso de cultivo continuo sin necesidad de tener que cambiar de medio en estos últimos. (Dunogent et al., 2019)

III. COCULTIVO (Composición, ventajas e inconvenientes):

Tras el desarrollo de los medios de cultivo único y secuencial se abrió la puerta al desarrollo de medios de cultivo alternativos como el cocultivo, desarrollado por la necesidad de imitar las condiciones in vivo. El cocultivo está basado en el uso de una monocapa de células “Helpers” que se cultivan junto con el embrión. El uso de cocultivos en humanos se produjo por primera vez en 1989, con los estudios publicados por *Wiemer, et al* y *Bongso, et al* en el que demostraban la mejora en los ratios de implantación y la calidad embrionaria usando un cocultivo con células epiteliales del oviducto humano obtenido por histerectomía. (Melnick & Spandorfer, 2015)(Yanez & Camarillo, 2017)

Independientemente del tipo celular utilizado, un cocultivo requiere de tres componentes principales: un medio de cultivo, células somáticas (en suspensión celular, piezas de tejido o monocapas) y el embrión. Para escoger el tipo de células somáticas más adecuado para el cocultivo, estas deben promover el desarrollo embrionario y ser compatibles con el embrión humano. Actualmente el tipo de células somáticas más utilizado en los cocultivos son las células endometriales debido a que se pueden obtener fácilmente mediante una biopsia en un ciclo previo, por ejemplo. Para el establecimiento del sistema de cocultivo endometrial, se extrae en primer lugar una muestra del endometrio en la fase lútea antes de un ciclo de FIV, posteriormente se somete a digestión enzimática, separación y criopreservación para su posterior uso en FIV. (Melnick & Spandorfer, 2015)

IV. ALTERNATIVAS DE CULTIVO EMBRIONARIO

Actualmente se han propuesto alternativas a los medios de cultivo usados de manera más habitual, incorporando nuevos componentes o cambiando las técnicas de cultivo. A día de hoy, existen diversos candidatos para mejorar los medios de cultivo, desde cultivos alternativos cambiando las condiciones del medio (como los cultivos en hipoxia), hasta la adición o sustitución de los componentes de este.

Uno de los posibles nuevos componentes para los medios de cultivo es el uso de la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1). Entre sus funciones destacan una mejora en los resultados de la fecundación, así como su intervención en el aumento de

la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática tras su contacto con el fluido oviductal, contribuyendo al control de la polispermia. En modelos animales se ha demostrado que la unión de OVGP1 y glicosaminoglicanos tipo heparina a la zona pelúcida son responsables del aumento de la resistencia de esta, por lo que la adición de OVGP1 en medios carentes de heparina es ineficaz. Además, el proceso es previo a la fecundación siendo además un proceso reversible. Por ello la producción de OVGP1 recombinante y su inclusión en los medios de cultivo comerciales podrían suponer un beneficio en el éxito de estos y su consecuente mejora. (Esther Velilla, Silvia Fernández, Mònica Parriego, 2012)

3.2. MICROFLUIDOS

Las técnicas usadas en la reproducción asistida han ido cambiando en las últimas décadas. La microfluídica es una tecnología emergente que podría servir como vía de mejora en las técnicas usadas actualmente en el laboratorio de FIV.

La microfluídica se caracteriza en el empleo y control de volúmenes muy pequeños (líquidos o gaseosos) y la complejidad de los principios físicos y dispositivos empleados. El uso de microfluidos brinda la posibilidad de crear nuevos dispositivos con el objetivo de mejorar las técnicas clásicas usadas en investigación biomédica o laboratorios como el de FIV.(Convery & Gadegaard, 2019)(Fernández Rivas, 2011)

A. ¿QUÉ SON LOS MICROFLUIDOS?

Para comprender los microfluidos se necesita comprender brevemente la física de los fluidos a pequeña escala que explican muchas de las ventajas del uso de microfluidos como los tiempos de reacción más rápidos o la cinemática de estos. En primer lugar, la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas están descritas por el número adimensional de Reynolds (Re) que responde a la fórmula:

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu}$$

Donde ρ es la densidad del fluido, v la velocidad, L es la dimensión lineal del sistema y μ la viscosidad dinámica de este. Siguiendo esta fórmula, cuando las dimensiones del sistema disminuyen, también disminuye el número de Reynolds. Cuando este número cae por debajo de 2000, el sistema entra en lo que se conoce como régimen

de flujo laminar, el cual tiene una cinemática de fluidos altamente predecible. Los sistemas de microfluidos casi siempre están en este régimen de flujo laminar. A su vez, el comportamiento de la superficie de los fluidos difiere también a macro y microescala. A microescala, estas fuerzas dominan frente a la gravedad, y por tanto, este método puede usarse para impulsar los microfluidos sin necesidad de bombas conduciendo al desarrollo de diferentes dispositivos analíticos como medidores de glucosa, pruebas de embarazo, etc. (Convery, 2019)

B. HISTORIA DE LOS MICROFLUIDOS

El nacimiento de los microfluidos surgió durante mediados el siglo XX debido a la necesidad para mejorar los sistemas mecánicos usados en las líneas telefónicas. Posteriormente, Jay Andrius patentó la técnica de fotograbado que permitía crear muchos más detalles en las placas de circuito, permitiendo que los semiconductores fueran fabricados en silicio. Este proceso se convertiría en el estándar en la fabricación de microelectrónica. Tras la invención del primer circuito integrado provocó una gran revolución en la microelectrónica y con ella, el comienzo de la “edad del silicio”.

Sin embargo, en el campo de la biotecnología su desarrollo se aceleró tras la publicación del trabajo de Manz, y cols. quien presentó el concepto de microsistemas de análisis total (TAS) el cual consistía en un sistema que permitía realizar todas las funciones necesarias en un análisis (Toma de muestras, preparación, transporte, reacciones químicas, detección...) de manera automática. Así mismo Manz y cols. presento posteriormente el Sistema de análisis total miniaturizado (μ TAS) que exponía las ventajas de la mecánica de fluidos en microescala en el análisis clínico. Con estos trabajos se allanó el camino para los posteriores avances en el campo de los microfluidos.

En 1979, Terry describía en sus trabajos su dispositivo el uso de una válvula y una bobina capilar y un sensor de conductividad. Tras la publicación de Terry se hizo evidente el potencial de la microfluídica para el desarrollo de nuevas herramientas de análisis molecular. Esto, sumado al avance en biología y biotecnología permitieron la manipulación celular, detección de pequeñas cantidades de sustancias y control de pequeños volúmenes.

En los 90, se describieron las gotas microfluídicas que consisten en la encapsulación de reactivos en la fase acuosa de una emulsión de agua y aceite que, con el desarrollo de una plataforma microfluídica permite producir rápidamente gotas uniformes. Aumentando mucho el rendimiento en los análisis bioquímicos. Otra tecnología emergente a principios del siglo XXI fueron los llamados “microfluidos abiertos” cuya aplicación más común está en las sondas microfluídicas, desarrolladas por David Juncker y cols. en 2005. Que permitieron que permitieron realizar estudios celulares in situ. Además, dichas sondas permiten el monitoreo en tiempo real siendo una tecnología de mucho interés en campos como inmunohistoquímica o farmacología.

El desarrollo de nuevas tecnologías a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, sumado a la adaptación de las tecnologías existentes han permitido el análisis de sistemas de manera mucho más rápida, eficiente y automatizada. A día de hoy, existe una tendencia aun mayor a adaptar la fabricación de los dispositivos para su uso en investigación biomédica y química abriendo así un camino a su implementación diaria en los laboratorios incluido el de FIV. (Convery, 2019; Fernández Rivas, 2011)

C. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS:

El uso de los dispositivos microfluidos han cobrado cada vez más importancia teniendo múltiples aplicaciones en todos los campos especialmente en el biotecnológico.

Una de las principales aplicaciones de estos dispositivos se basa en la utilización de microagujas para su utilización en análisis de sangre y el análisis de esta instantáneamente. A su vez, debido a la versatilidad de estos dispositivos, pueden ser llevados a zonas de investigación o de actuación, por ejemplo, monitorizar a los enfermos en una zona activa de infección sin tener que trasladarlos al hospital.

Por otro lado, aplicaciones como el encapsulamiento de sustancias ha recibido gran importancia debido a las posibilidades que presenta para el tratamiento de enfermedades difíciles de combatir, logrando sistemas coloidales complejos que permiten la liberación y suministro del fármaco en un lugar específico.

En la ingeniería de tejidos, el uso de dispositivos microfluídicos también ha cobrado una gran importancia demostrando la posibilidad de crecer tejidos complejos

gracias a su uso o su combinación con nanotecnología para desarrollar órganos artificiales.

En el proyecto genoma humano, la microfluídica ha impulsado en gran parte la velocidad de los experimentos, secuenciado, ahorro de compuestos, automatización, etc. por ejemplo, con el desarrollo de la Electroforesis capilar en microchip (MCE) de muestras de ADN (Fernández Rivas, 2011)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La revisión bibliográfica del presente Trabajo de Fin de Master ha sido realizada utilizando artículos publicados antes de agosto de 2021. Para la recopilación de la información del trabajo han sido consultadas diversos motores de búsqueda de información científica de prestigio de la comunidad científica como Web of Science, PubMed, SciELO, y Google Scholar, así como artículos de la revista ASEBIR. Para la búsqueda de información se utilizaron las palabras claves “embryo culture” “Embryo culture techniques”, “Assisted Reproductive Technology”, “human”, “Microfluidic system” y “microfluidics”

Se establecieron como criterios de inclusión los artículos publicados en los últimos 10 años (2011-2021) redactados en inglés o castellano. Sin embargo, han sido incluidos artículos de mayor antigüedad debido a su relevancia y su importancia en la realización del presente trabajo.

Se revisaron un total de 41 artículos de los cuales 14 han sido incluidos dentro de la presente revisión por su importancia y su relación directa con el tema de estudio. Se ha intentado dar preferencia a artículos de *reviews*, o artículos con gran relevancia entre la comunidad científica.

La mayor parte de los artículos eran artículos experimentales escritos fundamentalmente en inglés cuyo resultado era estadísticamente significativo o presentaba una relación directa con los objetivos del presente trabajo. La revisión de los resultados se ha centrado en un total de cinco artículos, haciendo hincapié a estudios de revisión y experimentales de los últimos años que serán comentados detalladamente en el siguiente apartado.

5. RECOPIACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

A continuación, y en base a la bibliografía consultada, se expondrán una selección de artículos enfocados en los microfluidos y sus posibles aplicaciones en el laboratorio de FIV:

En el año 2017, Yanez y cols. publicaron una revisión sobre el uso de microfluidos para el análisis de las propiedades biomecánicas de ovocitos y embriones con el objetivo de mejorar los resultados en las tecnologías de reproducción asistida. En su estudio proponen destacar los principales avances en microfluidos para medir la biomecánica embrionaria y poder predecir su potencial de desarrollo. En su revisión destacan que, a pesar de que el PGS (*Preimplantation genetic Screening*) es muy útil para la detección de aneuploidías, es posible que este no esté indicado en todo tipo de poblaciones debido a su alta invasividad. Por ello existen diversos biomarcadores mecánicos que podrían usarse como indicadores en la predicción de la calidad ovocitaria y embrionaria, y con ello poder evaluar la efectividad de los protocolos de estimulación, tomar mejores decisiones sobre los ovocitos o embriones que se van a criopreservar, microinyectar solo aquellos ovocitos de alta calidad, etc. El endurecimiento de la zona pelúcida es un factor mecánico que puede afectar negativamente al desarrollo de los ovocitos. En consecuencia, se han desarrollado dispositivos microfluídicos para observar las propiedades mecánicas de los ovocitos y embriones. Uno de ellos es el MTS, un sensor micro táctil desarrollado gracias a los avances en la microelectromecánica que consiste en una sonda de 20 μm de ancho que fue utilizada para medir la tendencia de ablandamiento de la zona pelúcida durante la maduración de los ovocitos. También destaca el desarrollo de diferentes dispositivos microfluídicos cuya función es la sujeción de ovocitos. En dichos dispositivos cada ovocito está contenido en su micropocillo y rodeado de diversos postes altos y flexibles. Una microaguja va a presionar el ovocito contra los postes que también se deforman. En base al desplazamiento de dichos postes, se pueden calcular las propiedades mecánicas del ovocito. Mediante el desarrollo de estos dispositivos también se ha podido comprobar la diferencia de rigidez entre los ovocitos sin fecundar y aquellos recién fecundados. El dispositivo usado aplicaba presiones variables a la zona pelúcida del ovocito antes y después de la fecundación y calculaba el endurecimiento de dicha zona en diferentes modelos mecánicos. Dichos estudios concluyeron que los embriones con bajo potencial de desarrollo eran demasiado blandos o rígidos. Sin embargo, aunque

diversos estudios han demostrado que las propiedades mecánicas del embrión predicen el potencial de desarrollo, se necesitan más estudios al respecto para probar dicha relación. Otro de los dispositivos microfluídicos desarrollados en torno al desarrollo embrionario constan de dispositivos que presentan volúmenes más pequeños de medio y una alta densidad de embriones para aumentar la concentración de factores de crecimiento secretados con el objetivo de replicar de la mejor manera posible las condiciones bioquímicas in vivo, así como otros dispositivos que se centran en replicar el entorno físico de las trompas.

Por otra parte, se han desarrollado plataformas de cultivo dinámico que, mediante el uso de microvibraciones, mostraban un aumento de las tasas de embarazo en aquellos embriones humanos sometidos a esta técnica frente al grupo control. Por otro lado, se han hecho grandes avances en la creación de dispositivos robotizados para la automatización del ICSI. Mediante el uso de una micropinza unido a un sensor de fuerza es posible medir las propiedades mecánicas del ovocito durante la inyección. Sin embargo, aún no se han desarrollado dispositivos que tengan totalmente automatizada esta técnica.

Por lo anteriormente expuesto, los microfluidos podrían suponer una mejora en las tasas de fecundación, así como en el cultivo y la selección de embriones. Por ello, aunque el uso de microfluidos sigue siendo un desafío tecnológico, los siguientes avances deben dirigirse a su integración junto al trabajo de laboratorio existente. (Yanez et al, 2017)

En este mismo año, Smith y cols. publicaron otra revisión sobre la aplicación de las tecnologías microfluídicas en la reproducción asistida, en su estudio hacen hincapié en el aislamiento de gametos con microfluidos. En el caso del esperma, su aislamiento permite facilitar la inseminación o el ICSI y dependiendo de las características del semen en el laboratorio se decide que espermatozoide o población de estos se usan para la técnica. Se han diseñado dispositivos que permiten el aislamiento de espermatozoides móviles basado en el flujo paralelo laminar de dos líquidos (uno de semen y otro de medio). Este flujo, mediante un mecanismo de bombeo pasivo orientado de forma horizontal, impulsado por la gravedad permite seleccionar los espermatozoides con mejor movilidad. A su vez, el ancho de los canales, así como la longitud de los canales

es modificable haciendo que el aislamiento de los espermatozoides móviles resultantes también varíe. A pesar de las limitaciones en torno a los volúmenes que procesa esta técnica, presenta gran ventaja frente al swim-up ya que estudios recientes han informado de que la centrifugación causa daño subletal al espermatozoide, causando daño en el ADN de los espermatozoides y como consecuencia un efecto negativo en las tasas de fertilización, calidad embrionaria, tasas de embarazo, etc. El uso de dispositivos microfluídicos en la selección espermática podría seleccionar espermatozoides sin poner en riesgo la integridad del ADN espermático. Además, se están desarrollando dispositivos capaces de procesar hasta 1ml de semen que permiten un gran avance en el futuro uso de estos dispositivos en la clínica. En el caso de ovocitos, se demostró que los microfluidos pueden utilizarse para la eliminación mecánica de las células del cumulo de ovocitos bovinos sin exposición enzimática, aunque estos beneficios no han sido reportados aun en ovocitos humanos.

Por otro lado, para la inseminación convencional e ICSI se ha demostrado que con el uso de microfluidos para la inseminación convencional, se consigue una incidencia de polispermia significativamente menor frente a la inseminación con microgotas. Sin embargo, con la técnica FIV/ICSI la incidencia de polispermia es muy baja, y el uso de microfluidos para evitarla puede no estar justificado. Por otro lado, también se demostró que la tasa de fecundación en estos dispositivos era mayor si la concentración de espermatozoides es baja, pero en la FIV humana, si las concentraciones son bajas se tomará la decisión de inseminar mediante ICSI. Sin embargo, en el ICSI existe el riesgo de lisis o degeneración de los ovocitos debido a la invasión producida por la inserción de la aguja. Sin embargo, este riesgo sigue siendo muy bajo.

El cultivo de embriones con microfluidos, puede proporcionar al menos tres características únicas; microambiente, entorno fluido dinámico y entorno químico dinámico. El microambiente está compuesto por factores individuales que tienen un impacto directo o indirecto con el embrión (bioquímico o biomecánico). En un principio, en 2004 se demostró que los embriones de ratón cultivados en microcanales presentaban tasas de escisión más rápidas, mayor tasa de llegada a blastocisto y menor tasa de degeneración en comparación con los cultivados en microgotas. Sin embargo, el cultivo de embriones humanos en microcanales a nivel práctico, se traducían en una alta incidencia de embriones anormales. Más tarde se desarrolló una plataforma de pantalla

Braille controlada mediante computadora que permitía mover pines de forma vertical controlando el bombeo de canales, proporcionando un control preciso del flujo del microcanal. Sin embargo, uno de los principales problemas que presentaba, fue la evaporación del medio, lo cual implicaba cambios en la osmolaridad. Para evitar estos cambios de evaporación y osmolaridad, incompatibles con la viabilidad del embrión, se desarrolló una membrana híbrida *PDMS-Parylene-PDMS* que redujo en gran medida estos cambios y permitió el desarrollo exitoso de los embriones de ratón. El diseño de este dispositivo, que además era compatible con el cultivo de embriones en incubadores, permitió diseñar un chip que no resultara en la muerte del embrión. Sin embargo, se descubrió que las células no se recuperaron correctamente. Por ello, los esfuerzos se centraron en la integración de microtúneles con pines que podrían proporcionar pulsos periódicos de medios de forma continua y precisa a frecuencias fisiológicas. En este sistema de fluido dinámico se reportaron tasas más rápidas de desarrollo antes de la implantación, desarrollo de blastos con más células y una implantación significativamente mejor usando como modelo embriones de ratón. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos producidos, aun no se han demostrado beneficios en los cultivos con microfluidos en embriones humanos.

En la criopreservación con microfluidos se han realizado también muchos avances en relación con la semiautomatización en la adición de los crioprotectores. Sin embargo, aunque se han hecho muchos avances a nivel teórico, aun hay que probar experimentalmente las combinaciones en el intercambio y combinaciones de los crioprotectores mejorando con ello la tasa de supervivencia.

El desarrollo de grandes avances en los microfluidos y su posible utilidad hacen de los microfluidos un campo de investigación en auge. La aplicación de estos dispositivos a la reproducción asistida humana depende del desarrollo de más estudios experimentales al respecto y de la repetición de estos en diferentes laboratorios para probar verdaderamente su viabilidad. Sin embargo, la investigación con microfluidos es un campo de estudio muy emocionante y alentador y que está en un alto nivel de desarrollo. (Smith et al, 2017)

Años más tarde, en 2019, Vaughan y cols. en su estudio titulado “*Métodos de selección espermática en el siglo 21*” amplían los estudios relativos a la selección

espermática de Smith y cols. e informan de la existencia de varios métodos de selección espermática comerciales basados en los principios de los microfluidos, basado en los estudios de Demirci y cols. Además, se demostró una mejora en la tasa de embarazo conseguida con aquellos embriones fecundados con espermatozoides seleccionados mediante plataformas microfluídicas. En la revisión de Vaughan también hacen hincapié en el uso de microfluidos con la integración de una óptica en el proceso de selección. Una de estas aplicaciones podría ser el uso de la espectroscopia Raman que distingue espermatozoides con una integridad nuclear mejorada. El uso de microfluidos combinado con las imágenes de alta velocidad, han permitido una cuantificación más precisa del movimiento de los espermatozoides en un entorno que imita su entorno natural. Es posible por ello, obtener imágenes 3D de espermatozoides. Estos dispositivos además integran un chip semiconductor para reconstruir digitalmente el volumen de la celda en el espacio 3D registrando la diferencia entre la luz de referencia y la onda de luz dispersada por la muestra. Estudios relacionados con microfluidos integrados en óptica han logrado desarrollar un sistema microfluídico que permite atrapar y realizar diversos análisis espermáticos. Todos los autores nombrados en el estudio opinan que la investigación en microfluidos parece ser la más prometedora de las técnicas de selección espermática. Además, parece tener un gran potencial así como una gran aplicabilidad en el laboratorio de FIV (Vaughan et al., 2019)

Acorde a la bibliografía consultada, en los últimos años se ha dado aún más prioridad al desarrollo de chips y dispositivos basado en la tecnología microfluídica. Por ello en 2019, se publicó un estudio experimental publicado por Oskouei y cols. sobre el diseño y la microfabricación de un sistema de maduración en chip para la disminución de la apoptosis. En su experimento se obtuvieron ovocitos inmaduros de ratones y se fecundaron con espermatozoides de ratones a temperatura, humedad y ciclo de luz constante. Los ovocitos se colocaron aleatoriamente en un medio de cultivo de maduración *in vitro* estático y dinámico durante 24h y se midió el nivel de peroxidación de lípidos en el medio de cultivo, así como la tasa de apoptosis *in vitro*. Seguidamente se utilizó un software para mejorar el rendimiento y optimizar el diseño del dispositivo microfluídico *IVM*. Tras su diseño y optimización se fabricó utilizando procedimientos de litografía publicados por el mismo grupo de investigación. Tanto los dispositivos pasivos como los activos constan de dos capas de PDMS, un microcanal de 7mm de longitud en la

capa superior y una matriz de microcámaras cuadradas en la inferior. Las cuatro cámaras se diseñaron para la captura de ovocitos. Durante dicho experimento, los ovocitos se cargaron en el puerto de entrada (con forma de embudo) y se transportaron a través del microcanal y se alojaron en la matriz de microcámaras. Para evaluar la fragmentación del DNA en los ovocitos se utilizó un ensayo TUNEL y una tinción con yoduro de propidio. Por otra parte, los ovocitos del control negativo se incubaron únicamente en una solución fluorescente que carecía de la enzima necesaria para el marcaje. La peroxidación lipídica se midió mediante la reacción del Ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA). Seguidamente se utilizó un ordenador para los análisis estadísticos y computacionales. Tras los análisis se comprobó que la utilización de un dispositivo de microfluidos para proporcionar un cultivo dinámico tenía efectos beneficiosos sobre la apoptosis, así como una disminución en la producción de MDA. (Oskouei et al., 2019)

Durante el último año, destaca el experimento desarrollado por Healy y cols. para la creación de un sistema de cultivo de folículos ováricos tridimensional artificial utilizando un sistema de microfluidos. El principal objetivo fue construir un sistema de microfluidos para crear un folículo ovárico en 3D de forma artificial y hormonalmente activo. Para el experimento se diseñó una capsula con regiones de núcleo y de la teca espacialmente separadas. Los ovocitos primarios se encapsularon en el núcleo rodeados por células de la teca y la granulosa aislados de ovarios de ratón siguiendo el protocolo descrito por Li y Hearn en su estudio. Por otro lado, las células de la granulosa se obtuvieron perforando suavemente los folículos ováricos aislados. Para la fabricación del dispositivo microfluídico de PDMS se utilizó una boquilla de tres alturas que formaría la capsula, una sección serpentina para la gelificación del alginato y un canal de extracción para transferir las capsulas a una fase acuosa. A su vez la boquilla presentaba múltiples alturas de canal. Tras el desarrollo del dispositivo se procedió al encapsulamiento mediante una solución madre de aceite, alginato de baja concentración y otras soluciones. La solución de la capsula consistía en alginato al 2% y d-manitol 300 mM en HEPES 10 mM. Tanto las capsulas como el alginato de baja concentración se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4° C. El dispositivo microfluídico descrito se llenó primero con agua destilada y el tubo de entrada solo se insertó en el dispositivo cuando la solución había llegado al final para evitar la formación de

burbujas. Se usó una jeringuilla con aceite y surfactante para la configuración inicial del dispositivo y así evitar la gelificación del alginato dentro de los canales antes de la estabilización de los flujos. Una vez se estabilizaron las capsulas la solución de aceite con el tensioactivos se substituyó por una emulsión de Calcio y aceite mineral provocando la gelificación de la cubierta de alginato mientras las capsulas viajaban por el serpentín creado. Se recolectaron entre 150-200 capsulas en 15 minutos y se cultivaron para análisis adicionales. Para confirmar una compartimentalización correcta se usaron perlas fluorescentes verdes en la solución del núcleo y la cubierta y perlas no fluorescentes para simular los ovocitos. Posteriormente, se tiñeron las células de la teca y la granulosa para comprobar que la distribución era la correcta. Tras una evaluación de la viabilidad celular y una medición hormonal de los folículos ováricos tridimensionales formados, se aislaron y encapsularon los ovocitos a través del dispositivo microfluídico previamente descrito. Las capsulas con los ovocitos fueron colocadas en un medio de crecimiento que se cambió cada dos días. Se confirmó la distribución espacial correcta tras la encapsulación, los diámetros de la capsula no mostraron cambios en el diámetro durante el cultivo. A nivel hormonal solo se mostró un nivel significativamente más alto de androstenediona en las capsulas 3D frente al control 2D y unos niveles más bajos para la progesterona. En los primeros intentos de encapsular los ovocitos resultaron en un amontonamiento debido a una alta adhesividad de estos. Finalmente se encapsularon los folículos secundarios y tras seis días de cultivo el tamaño de las capsulas y el tamaño del ovocito no mostraron cambios durante el cultivo ni se observó la primera extrusión del corpúsculo polar. En el estudio comentan que el objetivo del dispositivo microfluídico es mejorar el tratamiento clínico en el laboratorio de FIV, aunque comentan que es importante minimizar el tiempo sin cultivo para optimizar la viabilidad. Sin embargo, se requiere más trabajo en el sistema para optimizar el tamaño de las capsulas, así como el numero adecuado de células de la teca y la granulosa alrededor del ovocito para lograr un entorno donde el ovocito primario pueda madurar. (Healy et al., 2021)

6. CONCLUSIONES

En base a la bibliografía analizada en el presente trabajo de fin de Máster, cuyo objetivo principal ha sido realizar una revisión acerca de los estudios recientes publicados en el campo de la microfluídica aplicada a la RHA, podemos concluir que:

1. La microfluídica y el uso de microfluidos es una tecnología emergente con un potencial y aplicabilidad muy grande en múltiples campos incluido la reproducción, a la cual se le está dando especial importancia en los últimos años, abriendo así una nueva vía de investigación para mejorar los resultados en el laboratorio de FIV.
2. Gracias a su gran potencial y al rápido avance en la investigación, el trabajo con dispositivos microfluidos aumenta la eficacia del trabajo en el laboratorio y supone una revolución en los campos de análisis clínico y biológico, así como en la RHA.
3. Los sistemas microfluídicos abren paso a la automatización de diversas tareas desarrolladas en el laboratorio de FIV como la selección espermática, la criopreservación de gametos y embriones, la selección embrionaria e incluso el ICSI.
4. A pesar de que existen grandes avances en el uso de microfluidos, todavía son necesarios mas estudios y diseños mas optimizados para poder utilizarlo a gran escala dentro del laboratorio de FIV. Sin embargo, existe una gran esperanza debido a la mejora en los resultados y en la calidad de los ovocitos y embriones cultivados mediante el uso de microfluidos.

7. BIBLIOGRAFIA

- Convery, N., & Gadegaard, N. (2019). 30 Years of Microfluidics. *Micro and Nano Engineering*, 2(May 2018), 76–91. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.01.003>
- Dorado, M., Oliveira, D., Lorenzo, C., G, V., & Marco, Y. (2006). *Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida Evolution of the culture media in assisted reproduction techniques*. 23, 31–36.
- Dunogent, L., Cattaneo, A., Gnocchi, D., Irigoyen, M., & Tessari, L. (2019). *Comparación de un medio de cultivo secuencial y uno continuo para el desarrollo in vitro de embriones humanos*. 1–7.
- Esther Velilla, Silvia Fernández, Mònica Parriego, M. S. (2012). IV Recogida de datos de DGP en España: 1 de enero del 2008 a 31 de diciembre de 2009. *Revista de Embriología Clínica y Biología de La Reproducción*, 17, 44–52.
- Fernández Rivas, D. (2011). Microfluidos: Nuevas fronteras. *Revista Cubana de Física*, 28(1), 60–67.
- Healy, M. W., Dolitsky, S. N., Villancio-Wolter, M., Raghavan, M., Tillman, A. R., Morgan, N. Y., Decherney, A. H., Park, S., & Wolff, E. F. (2021). Creating an artificial 3-dimensional ovarian follicle culture system using a microfluidic system. *Micromachines*, 12(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/mi12030261>
- Melnick, A. P., & Spandorfer, S. D. (2015). Embryo coculture: A review. *Journal of Epidemiological Research*, 2(1), 15. <https://doi.org/10.5430/jer.v2n1p15>
- Mercader, A., Valbuena, D., & Simón, C. (2006). Human Embryo Culture. *Methods in Enzymology*, 420(06), 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)20001-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)20001-6)
- Morbeck, D. E., Ph, D., Krisher, R. L., Ph, D., Herrick, J. R., Ph, D., Baumann, N. A., & Ph, D. (2014). Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*, 102(3), 759-766.e9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.043>
- Oskouei, B. S., Ph, D., Zargari, S., Sc, M., Shahabi, P., & Ph, D. (2019). *Design and Microfabrication of An On-Chip Oocyte Maturation System for Reduction of Apoptosis*. 4, 32–39. <https://doi.org/10.22074/cellj.2021.7056>.This
- Paz, M., Cicaré, J., Menzo, F., Domenech, L., Reproducción, P. P.-, & 2017, U. (2017). Cultivo en medio único versus secuencial: efectos en los resultados clínicos y su relación con la presencia de granulaciones citoplasmáticas. *Reproducción*, 32(1), 6–16. http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2017/numero_1/10-20-TRABAJO PAZ.pdf
- Smith, G. D., & Takayama, S. (2017). *Application of micro fluidic technologies to human assisted reproduction*. 23(4), 257–268. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw076>
- Vaughan, D. A., Sakkas, D., & Gardner, D. K. (2019). Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of Reproduction*, 101(6), 1076–1082. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz032>
- Yanez, L. Z., & Camarillo, D. B. (2017). Microfluidic analysis of oocyte and embryo biomechanical properties to improve outcomes in assisted reproductive

technologies. *Molecular Human Reproduction*, 23(4), 235–247.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaw071>

