

EL MÉTODO CRYOTEC

Manual de uso

“Para Oocitos y Embriones”



Vitrificación

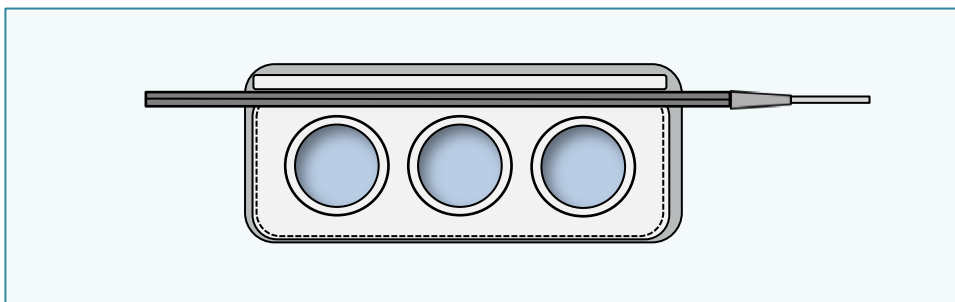
Materiales

- **Cryotech Vitrificación Kit**
 - Solución de Equilibramiento (ES): 1 vial de 1.0 ml
 - Solución de Vitrificación (VS): 2 viales de 1.0ml
 - 4 Cryotecs
 - 3 Placas de Vitrificación con 3 wells c/u
- Lupa estereoscópica (Apague la platina térmica)
- Cronómetro
- Tijeras
- Micro pipeta para 300µl

Preparación

1. Coloque los viales ES y VS a temperatura ambiente (25~27°C) como mínimo 1 hora antes de la vitrificación.
2. Abra la cubierta del Cryotec con una tijera. Escriba la información necesaria en el mango del Cryotec, y prepare la Placa de vitrificación (Fig.1).

Fig.1. Placa de vitrificación con el Cryotec



3. Prepare el nitrógeno para usar.
4. Saque de la incubadora la placa que contiene el oocito/embrión.

Equilibramiento (12 – 15 min)

1. Llene los wells de la Placa de vitrificación con 300µl ES y 300µl VS, respectivamente (Fig. 2). Coloque la tapa de la Placa de vitrificación inmediatamente.

Fig. 2. Preparación de cada solución

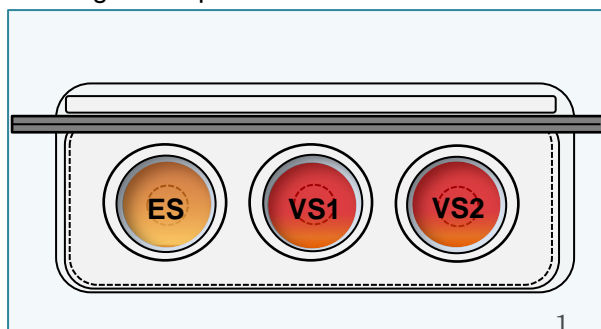
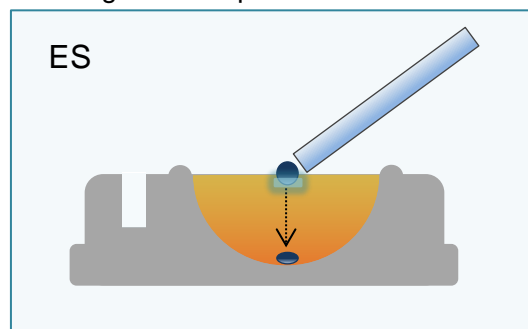


Fig. 3. ES Equilibramiento

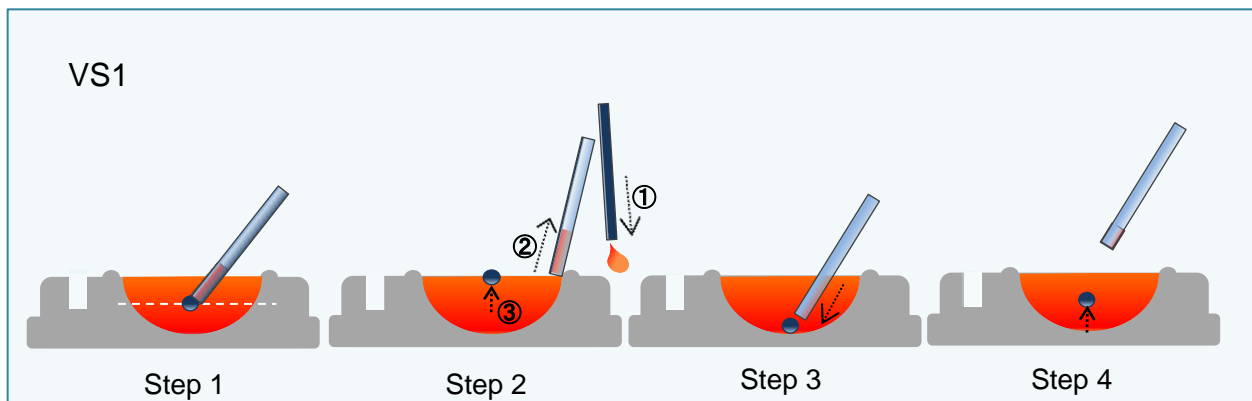


2. Aspire el oocito/embrión con la pipeta Pasteur con poco medio.
3. Coloque el oocito/embrión con poca cantidad de medio en la superficie del ES.
Ponga en marcha el cronómetro. El oocito/embrión irá lentamente hacia el fondo del well, encogiéndose mientras se hunde, verá que aumenta el espacio perivitelino (Fig. 3).
4. Coloque la tapa y espere a que se recupere volviendo a su forma original. Cuando el oocito/embrión recupera completamente su volumen finaliza el equilibramiento.

Si Usted no pudiese confirmar la completa recuperación, continúe con el procedimiento aguardando 15 min para oocitos y blastocistos (160-200 μm de diámetro), y 12 min para embriones de 4 -8 células.

Vitrificación 1 (30 - 40 seg)

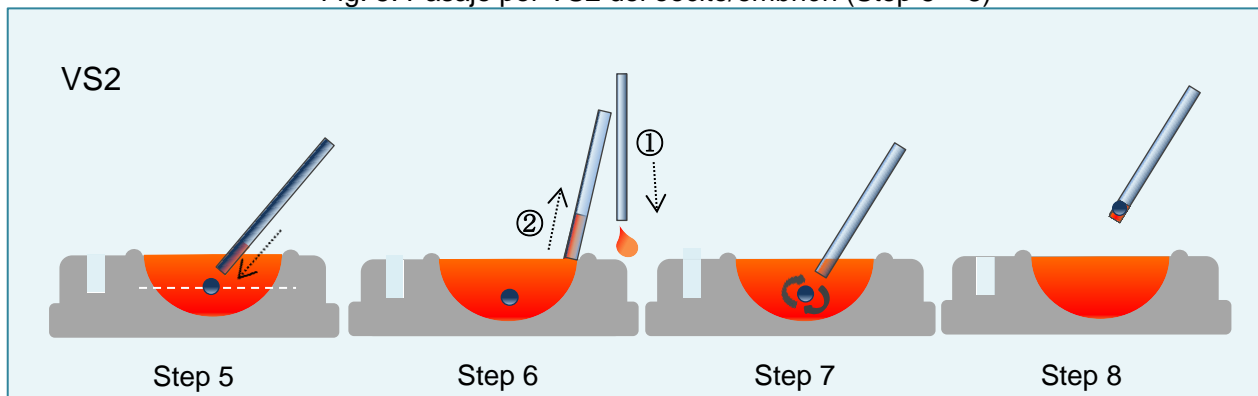
Fig. 4. Pasaje por VS1 del oocito/embrión (Step 1 – 4)



1. Aspire el oocito/embrión con poco medio **ES** con la pipeta.
2. Coloque el oocito/embrión en la mitad de la profundidad del **VS1** (Fig. 4 - Step 1).
3. Expulse el medio **ES** remanente dentro de la pipeta (Step 2/1). Aspire medio **VS1** fresco del borde externo del well (Step 2/2).
4. El oocito/embrión flotará inmediatamente hacia la superficie del **VS1** (Step 2/3).
Aspire oocito/embrión colocándolo en la punta de la pipeta.
5. Deposítelo en el fondo del well (Step 3).
6. El oocito/embrión flotará suavemente hasta mitad de la profundidad del well y se detendrá (Step 4).
7. Expulse el medio **VS1** remanente de la pipeta y aspire medio nuevo **VS2**.
Aspire el oocito/embrión colocándolo en la punta de la pipeta.

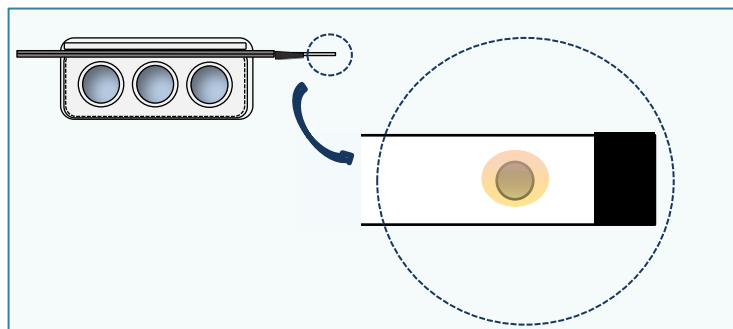
Vitrificación 2 (10 – 20 seg)

Fig. 5. Pasaje por VS2 del oocito/embrión (Step 5 – 8)



8. Coloque el oocito/embrión en la mitad de la profundidad del **VS2** (Step 5).
9. Expulse el medio **VS** remanente dentro de la pipeta (Step 6/1) y aspire medio **VS2** fresco del borde externo del well (Step 6/2).
10. Mezcle la solución **VS2** alrededor del oocito/embrión para lograr un buen intercambio de medio (Step 7).
11. Tome el oocito/embrión colocándolo en la punta de la pipeta (Step 8).
13. Coloque el oocito/embrión cerca de la punta del Cryotec con mínimo volumen de **VS2**. (se recomienda 1 oocito/embrión por Cryotec) (Fig. 6).
14. **Inmediatamente** sumerja el Cryotec en nitrógeno líquido.
15. Coloque la cubierta del Cryotec dentro del nitrógeno líquido.

Fig. 6. Oocito/embrión sobre el Cryotec



Nota 1

Use una pipeta Pasteur de diámetro correcto:

- 140-150 μm para Oocitos y Embriones de 4-8 células.
- 160~200 μm para blastocistos.

Nota 2

El mejor momento para vitrificar un blastocisto es cuando tiene un diámetro de entre 160~220 μm para asegurar una supervivencia perfecta.

Nota 3

Todas las soluciones solo pueden ser utilizadas dentro de los 30 días de abiertos los tubos que las contienen siempre que esa apertura haya sido realizada en esterilidad.