



# EL MÉTODO CRYOTEC

[Manual completo para asegurar 100% de Supervivencia de Ovocitos y Embriones]



*Nuestro objetivo es proporcionar a todos nuestros pacientes alrededor del mundo una tasa confiable de supervivencia del 100% a través del uso de la técnica de vitrificación más eficaz del mundo.*

Todos los materiales y métodos necesarios para lograrlo se encuentran en estos dos paquetes:

“Cryotech® Kit de Vitrificación 101”

“Cryotech® Kit de Calentamiento 102”

Esperamos que alrededor del mundo todos los pacientes de infertilidad puedan disfrutar de estos paquetes llenos del milagro de la ciencia.



## Lista de contenido

<b>1 . Operación básica</b>	▪ ▪ ▪ P. 4
Aumento del Microscopio	▪ ▪ ▪ P. 4
Posición del ovocito/embrión durante la aspiración	▪ ▪ ▪ P. 4
<b>2 . Protocolo de vitrificación</b>	▪ ▪ ▪ P. 5
Materiales	▪ ▪ ▪ P. 5
Preparación para la Vitrificación	▪ ▪ ▪ P. 5
[PASO 1] Equilibrio a través de ES	▪ ▪ ▪ P. 6
[PASO 2] Equilibrio a través de VS1	▪ ▪ ▪ P. 9
[PASO 3] Encogimiento a través de VS2	▪ ▪ ▪ P. 11
[PASO 3] Colocación del ovocito/embrión	▪ ▪ ▪ P. 12
[PASO 3] Congelación ultra-rápida	▪ ▪ ▪ P. 12
<b>3 . Protocolo de calentamiento</b>	▪ ▪ ▪ P. 14
Materiales	▪ ▪ ▪ P. 14
Preparación para el Calentamiento	▪ ▪ ▪ P. 14
[PASO 4] Calentamiento a través de TS	▪ ▪ ▪ P. 15
[PASO 5] Dilución a través de DS	▪ ▪ ▪ P. 17
[PASO 5] Dilución a través de WS1	▪ ▪ ▪ P. 18
[PASO 6] Lavado a través de WS2	▪ ▪ ▪ P. 19

# 1. Operación básica

## [Aumento del Microscopio]

El método Cryotec utiliza dos niveles de aumento para un funcionamiento sencillo.

**Aumento pequeño:** Para manipular el ovocito/embrión (x12-15).

- Este aumento permite ver fácil e inmediatamente el ovocito/embrión completo.

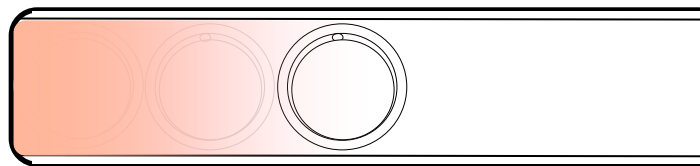
**Aumento grande:** Se utiliza para observar al ovocito/embrión (x45-55).

- Este aumento le permite verificar a detalle cada área.

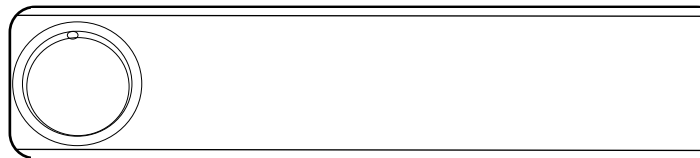
## 【La posición del ovocito/embrión durante la aspiración】

Al usar los protocolos del Método Cryotec sólo necesita estar familiarizado con tres posiciones del ovocito/embrión en la pipeta.

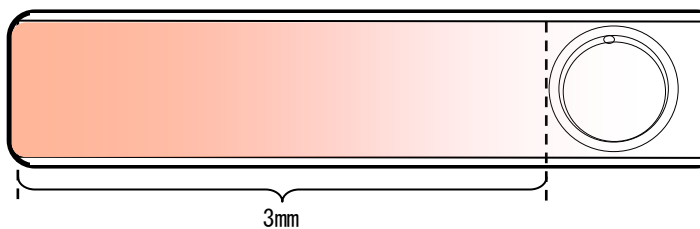
1. Aspirar una pequeña cantidad de la solución (aproximadamente el doble del diámetro del ovocito) después del ovocito/embrión (procedimiento estándar).



2. Colocar el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (equilibrio por vitrificación).

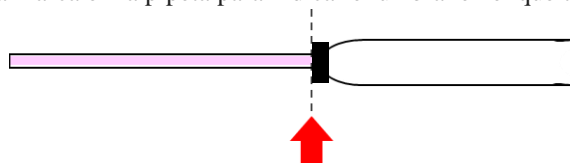


3. Aspirar 3 mm de solución después del ovocito/embrión (dilución mediante TS y DS).



### Consejo:

Todas las acciones que involucran a la pipeta y al ovocito/embrión pueden hacerse significativamente más sencillas usando la acción capilar (un proceso natural) para aspirar con anticipación 1 mm de solución en la pipeta. Para hacer las cosas aún más fáciles, se puede hacer una marca en la pipeta para indicar el umbral en el que termina la absorción capilar.



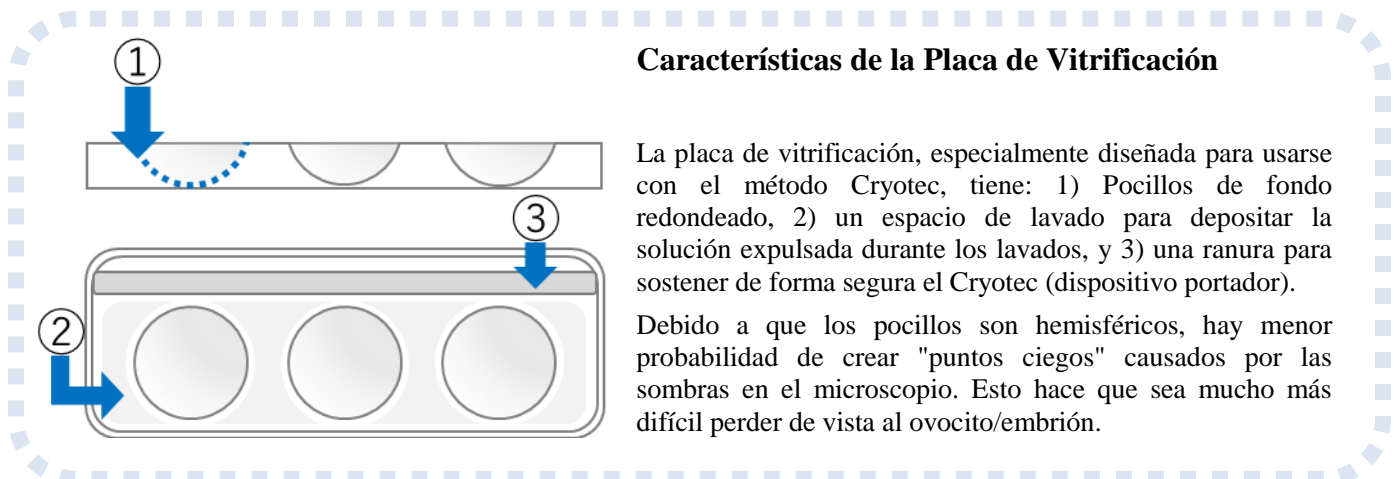
## 2. Protocolo de vitrificación

### Propósito de la criopreservación por vitrificación

El uso de la criopreservación por vitrificación evita cualquier cambio o deterioro en la calidad del ovocito/embrión, asegurando la conservación del mismo estado en que estaba antes de la congelación.

### 【Materiales】

- **Cryotech® Kit de vitrificación 101**
  - Solución de Equilibrio (ES): 1.0 ml/vial×1
  - Solución de Vitrificación (VS): 1.0ml/vial×2
  - 4 Cryotecs
  - 3 placas de vitrificación con 3 pocillos cada uno (y su cubierta)
- **Microscopio (con la platina de calentamiento apagada)**
- **Temporizador (con función de conteo)**
- **Pinzas**
- **Tijeras**
- **Micropipeta (con capacidad para 300µl)**
- **Pipeta Pasteur (con boquilla) o Stripper (con puntas)**
- **Contenedor de nitrógeno líquido**



### Características de la Placa de Vitrificación

La placa de vitrificación, especialmente diseñada para usarse con el método Cryotec, tiene: 1) Pocillos de fondo redondeado, 2) un espacio de lavado para depositar la solución expulsada durante los lavados, y 3) una ranura para sostener de forma segura el Cryotec (dispositivo portador).

Debido a que los pocillos son hemisféricos, hay menor probabilidad de crear "puntos ciegos" causados por las sombras en el microscopio. Esto hace que sea mucho más difícil perder de vista al ovocito/embrión.

### [Preparación de la Vitrificación]

1. Mantenga la habitación a una temperatura ambiente entre 25°C y 27°C.
2. Mantenga los viales ES y VS a temperatura ambiente (26±1 °C: 25-27°C) al menos durante 1 hora antes de realizar el protocolo.
 

**(VERIFICAR: Observe y toque los viales antes de usarlos para descartar la presencia de cualquier anomalía, como coloraciones inusuales o temperaturas más altas o bajas de lo adecuado.)**
3. Prepare la pipeta Pasteur con un diámetro interior que coincida con el diámetro del ovocito/embrión que será vitrificado:
  - Para ovocitos/embriones, 140-150µm.
  - Para blastocistos, 160-220µm.
4. En caso de que el diámetro del blastocisto a vitrificar sea mayor de 220µm, lleve a cabo el siguiente proceso de pre-encogimiento:
  - Sumerja el blastocisto en una solución hipertónica (DS:WS = 2:3) hasta que alcance el tamaño adecuado. Este es el método de contracción no invasiva más eficaz.

## [PASO 1]

### Equilibrio en el ES (8-15 minutos: a temperatura ambiente)

El propósito de este paso es introducir agentes crioprotectores (CPAs) en el interior de la célula. El final de este paso se confirma con la recuperación completa del volumen de la célula.

#### Mecanismo de la contracción y recuperación de las células

Debido a que el interior de la célula es medio de cultivo (con una presión osmótica de aproximadamente 300) y el espacio extracelular está compuesto por ES (con una presión osmótica de aproximadamente 2,400), el agua dentro de la célula fluirá hacia afuera de ella debido a esta diferencia entre las presiones osmóticas intra y extracelulares. Al mismo tiempo, los CPAs pueden penetrar la membrana celular y fluyen hacia dentro la célula. Debido a que las presiones osmóticas intra y extracelulares intentan naturalmente equilibrarse, estas reacciones ocurren simultáneamente. Sin embargo, la velocidad a la que el agua fluye hacia afuera de la célula es ligeramente más rápida que la de los CPAs que fluyen hacia adentro de la célula. Esto significa que el ovocito/embrión primero se contraerá al salir el agua y luego retornará a su volumen original al entrar los CPAs.

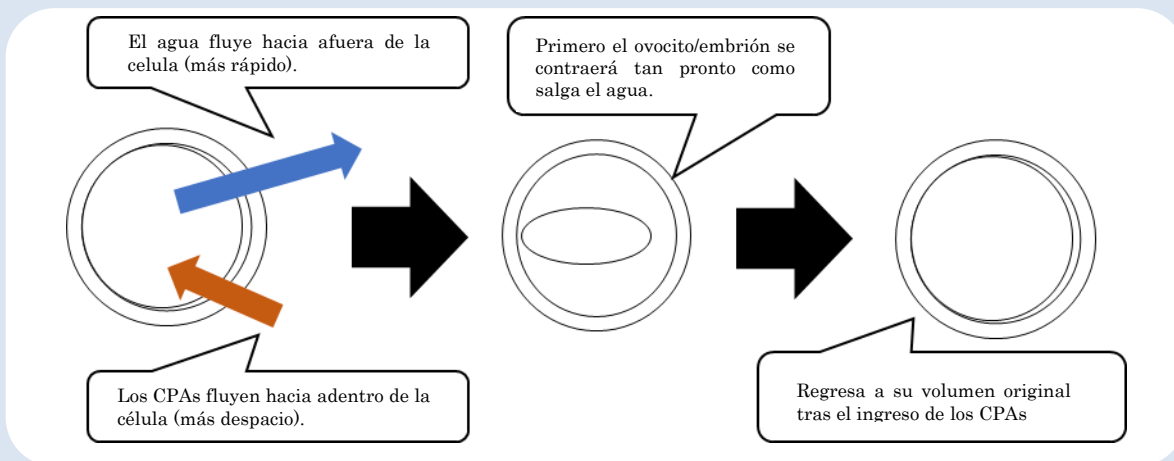
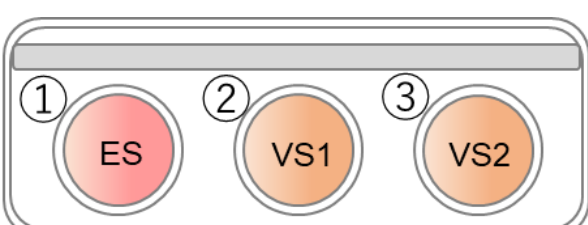


	Figura	Procedimiento
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rellenar el pocillo 1 de la placa de Vitrificación con 300 µl de ES a temperatura ambiente (①).</li> <li>2. Llene cada uno de los otros pocillos con 300 µl de VS a temperatura ambiente (② y ③).</li> </ol>

**VERIFICAR: Evite formar burbujas en la distribución.**

Fije la punta a la micropipeta de 300 µl. Aspire 300 µl de solución en la pipeta y expulse la totalidad de la misma dentro del vial. Luego aspire nuevamente la solución y realice la distribución lentamente. Esto evitará la formación de burbujas.

**VERIFICAR: Si se forman burbujas, deje que la solución se asiente.**

Si las burbujas se forman en la solución, éstas desaparecerán si la solución permanece intacta por un tiempo. No intente eliminar las burbujas con la micropipeta, ya que esto cambiará la cantidad de solución dentro del pocillo.

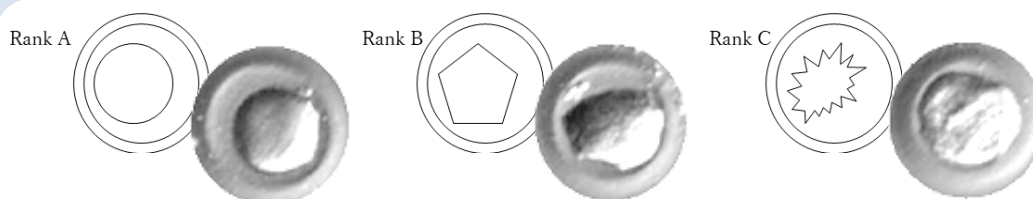
2	<p style="text-align: center;">Placa de cultivo</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inspeccione y observe con detenimiento el ovocito/embrión con aumento grande, prestando especial atención al tamaño de la zona pellucida en relación al espacio perivitelino (en ovocitos) o la cavidad (en blastocistos) para confirmar que el ovocito/embrión haya recuperado totalmente su volumen original durante el equilibrio (①).</li> <li>2. Aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta Pasteur junto con una pequeña cantidad de medio de cultivo (aproximadamente del tamaño de 2 ovocitos). (②).</li> </ol>
---	---	---

**VERIFICAR:** Tenga en cuenta que una vez que el ovocito/embrión se coloca en el ES, su volumen comenzará a disminuir inmediatamente. Es importante confirmar encogimiento ya que, si no encoge, el ovocito/embrión no es viable.

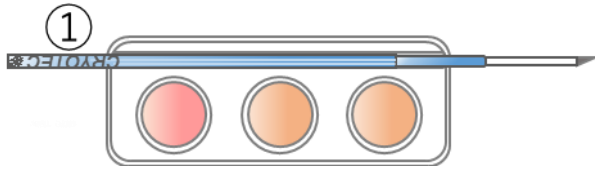
3	<p style="text-align: center;">ES</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque el ovocito/embrión en la superficie del <b>ES</b>, directamente en el centro (①). No importa si trae consigo un poco de medio de cultivo.</li> <li>2. Inicie el temporizador.</li> <li>3. El ovocito/embrión comenzará a encogerse y se hundirá hasta el fondo del pocillo (ésto debe suceder dentro de 30 segundos) (②). A los 90 segundos, el ovocito/embrión debe haber alcanzado el tamaño más pequeño.</li> <li>4. Continúe esperando y observe cómo el ovocito/embrión recupera completamente su volumen original.</li> </ol>
---	---------------------------------------	---

## Evaluación de la calidad de ovocitos/embriones en función a su forma durante la contracción

Usted puede evaluar la calidad del ovocito/embrión por la permeabilidad de la membrana de su célula. Un ovocito/embrión de alta calidad mantendrá su forma esférica mientras se encoge (Rango A). Si hay variación en la permeabilidad de la membrana, se formarán bordes irregulares (Rango B), y a medida que la calidad disminuye se mostrará una forma extremadamente irregular (Rango C). Tenga en cuenta que estos grados no afectan la tasa de supervivencia; sin embargo, esto representa la calidad del ovocito/embrión en sí, puede indicar una diferencia en la fertilidad, la capacidad de desarrollo, o la tasa de embarazo en una etapa posterior.



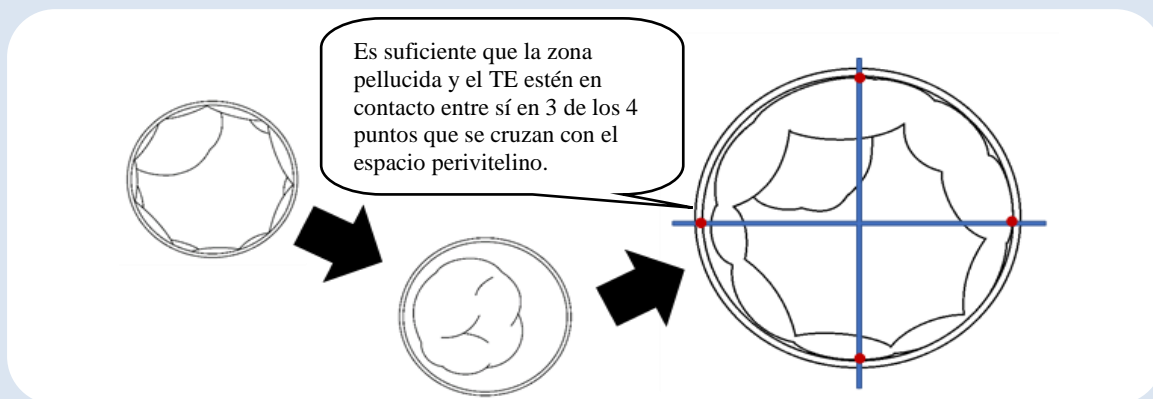
4



1. Mientras espera a que el ovocito/embrión recupere su volumen, retire la pajuela que contiene el Cryotec en el empaque y prepare el Cryotec. Llene la información de los ovocitos/embriones en la parte posterior (opuesto al logotipo) y coloque el Cryotec en la ranura en la placa de Vitrificación, asegurándose de mantener el logotipo hacia arriba (1).
2. Prepare el nitrógeno líquido fresco en el contenedor.
3. Una vez que el ovocito/embrión haya recuperado completamente su tamaño original, el equilibrio en **ES** estará completo.

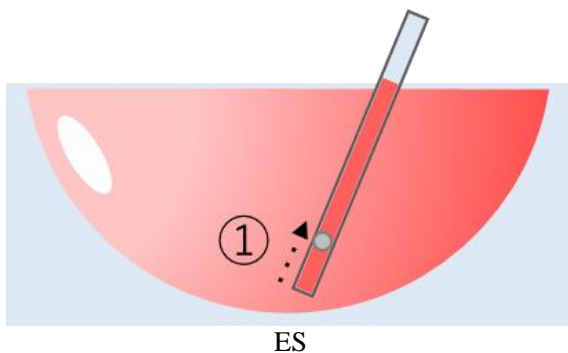
### Determinación del final del equilibrio

Si la recuperación del volumen no puede ser confirmada, o si usted no está seguro según su juicio de la recuperación completa, los tiempos máximos para el equilibrio en ES son los siguientes: ovocitos y blastocistos (160  $\mu\text{m}$ -220  $\mu\text{m}$  de diámetro) – 15 minutos; embriones en fase de 4-8 células – 12 minutos. Se ha determinado que se produce un equilibrio suficiente después de 15 ó 12 minutos, respectivamente.



Algunas veces puede ser difícil determinar si el volumen de un blastocisto se ha recuperado completamente debido a la cavidad que presenta. Por lo tanto, en el caso de los blastocistos, inspeccione el contacto entre la zona pellucida y el TE como se muestra en la figura de arriba y determine la recuperación. Viendo el blastocisto desde la parte superior, imagine una cruz superpuesta en la célula; si la zona pellucida y el TE están en contacto entre sí en 3 de los 4 puntos que se cruzan con el espacio perivitelino, el blastocisto se ha recuperado lo suficiente.

5



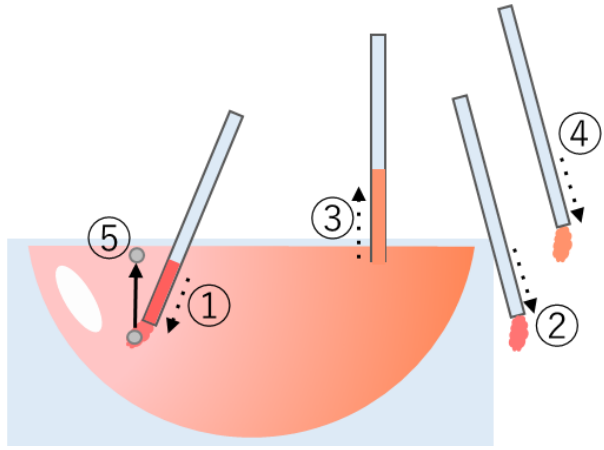
1. Aspire el ovocito/embrión con una pequeña cantidad de ES (aproximadamente del tamaño de 2 ovocitos) (1).



## [PASO 2]

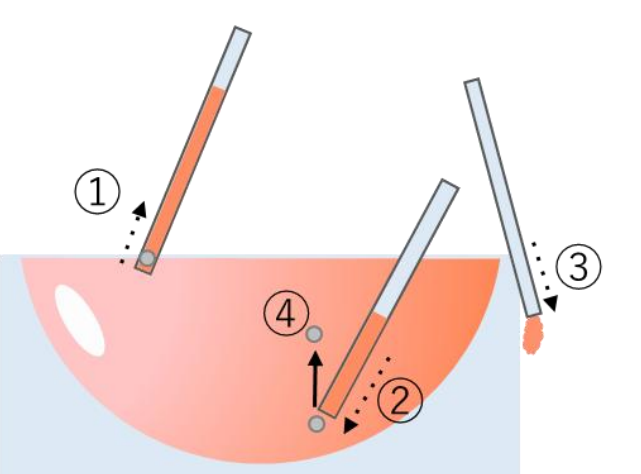
### Equilibrio en el VS1 (30-60 segundos)

El propósito de VS1 es reemplazar todo el ES intracelular con VS. Este paso está completo cuando las densidades de la célula y del VS1 son iguales.

	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Deposite el ovocito/embrión a media profundidad de VS1 (①).</li> <li>2. Expulse todo el ES restante de la pipeta en la ranura de lavado del pocillo (②).</li> <li>3. Aspire VS1 fresco del borde del pocillo (③) y expúlselo rápidamente (④).</li> <li>4. El ovocito/embrión flotará rápidamente a la superficie de VS1 (⑤). (Asegúrese de enfocar inmediatamente la superficie de VS1 tan pronto como coloque el ovocito/embrión).</li> </ol>

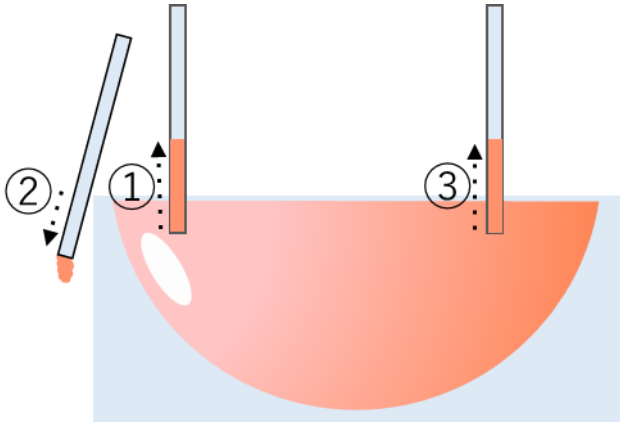
#### VERIFICAR:

Debido a que el ovocito/embrión liberado flotará rápidamente a la superficie, el enfoque de su microscopio debe hacerse en la superficie del líquido, lo que le permite confirmar la presencia del ovocito/embrión.

2	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aspire VS1 fresco del borde del pocillo, luego aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (①).</li> <li>2. Deposite el ovocito/embrión en la parte inferior del pocillo de VS1 (②). (Asegúrese de depositar sólo el ovocito/embrión.)</li> <li>3. Expulse todo el ES restante de la pipeta en la ranura de lavado del pocillo (③).</li> <li>4. El ovocito/embrión debe flotar lentamente hasta media profundidad y detenerse completamente. Esto confirma el final del equilibrio en VS1 (④).</li> </ol>
---	---	--

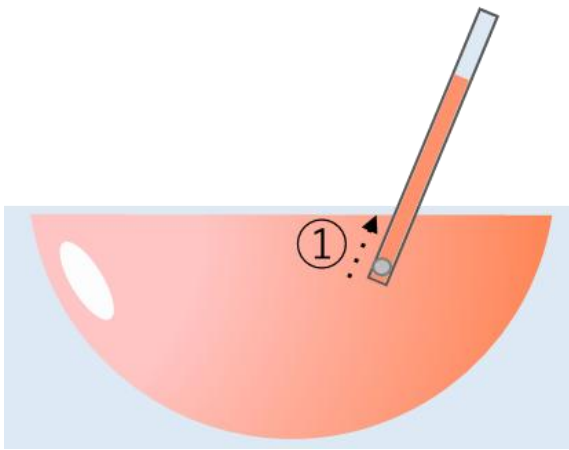
#### VERIFICAR:

Utilice el aumento grande del microscopio para confirmar que el ovocito/embrión se haya detenido completamente en el nivel medio de la solución. Asegúrese de que el ovocito/embrión permanezca enfocado durante un buen tiempo, confirmando que haya dejado de flotar.

<b>3</b>	 <p>VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aspire y expulse VS2 fresco del borde del pocillo de VS2 (① y ②).</li> <li>2. Aspire VS2 fresco una vez más desde el borde del pocillo de VS2 (③)</li> </ol>
----------	--	--

**VERIFICAR:**

El propósito de aspirar VS2 fresco antes de aspirar el ovocito/embrión del VS1 es evitar la introducción de VS1 en VS2.

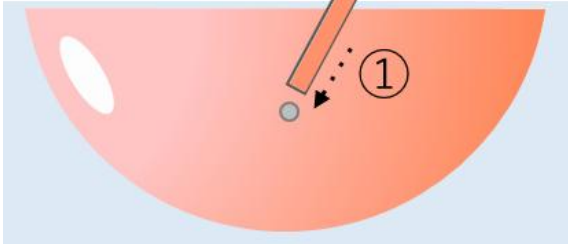
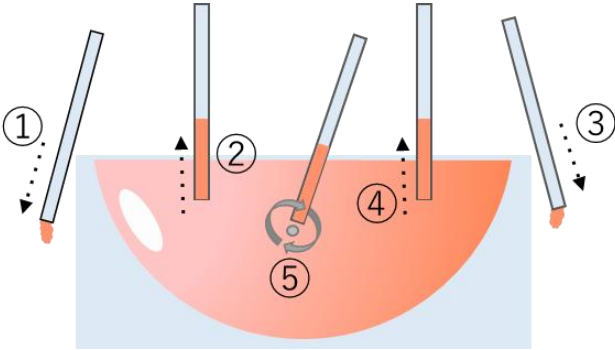
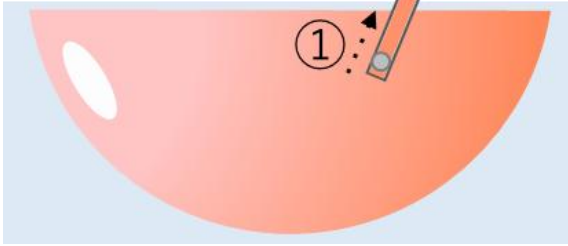
<b>4</b>	 <p>VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aspire el ovocito/embrión del VS1 en la punta de la pipeta (①).</li> </ol>
----------	---	--

## [PASO 3]

### Encogimiento en el VS2 (10-20 segundos)

El propósito de VS2 es confirmar que el ES haya sido reemplazado por el VS completamente. Esto se hace de dos maneras:

1) El ovocito/embrión está encogido (con forma de media luna), y 2) el ovocito/embrión no flota. (esto significa que no hay más ES dentro del ovocito/embrión).

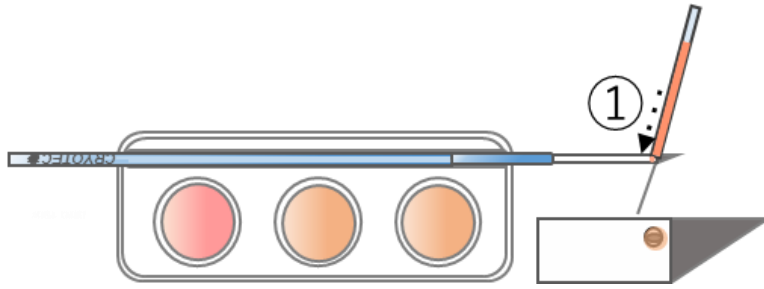
	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Deposite el ovocito/embrión en la parte central de VS2 (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Expulse todo el VS1 restante de la pipeta en la ranura de lavado del pocillo (①), y aspire/expulse VS2 fresco del borde del pocillo (② y ③).</li> <li>2. Aspire VS2 fresco una vez más (④).</li> <li>3. Agite la solución alrededor del ovocito/embrión para observarlo desde múltiples ángulos con el fin de confirmar que está contraído completamente (⑤).</li> </ol>
3	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (①).</li> </ol>

#### VERIFICAR:

Si puede observar el ovocito/embrión encogido sin mover la solución no hay necesidad de agitarlo.

## Colocación del ovocito/embrión

4



1. Coloque el ovocito/embrión con una pequeña cantidad de VS2 cerca del marcador (triángulo negro) de la lámina Cryotec (①).

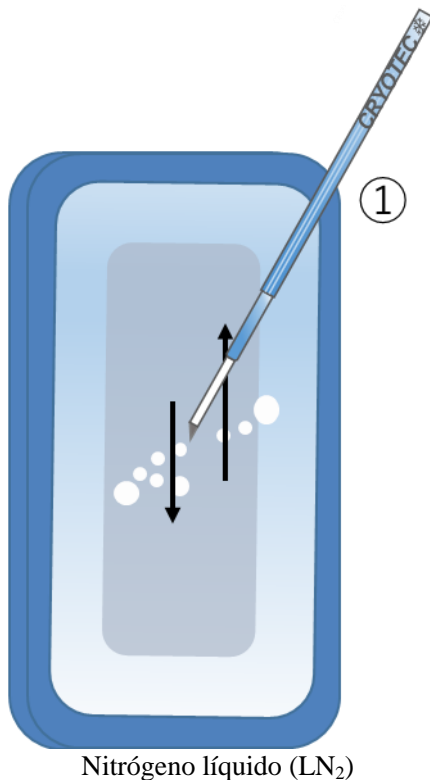
**VERIFICAR: 1 ovocito = 1 gota. NO REDUZCA el volumen de la gota.**

### No intente reducir el volumen de la gota

Los métodos convencionales intentan minimizar el tamaño de la gota con el fin de aumentar la tasa de enfriamiento. Sin embargo, dado que el medio de congelación utilizado en el método Cryotech tiene mayor capacidad de vitrificación que los métodos convencionales, no hay necesidad de hacer esto. En el intento de minimizar la gota, usted puede incrementar la presión sobre el ovocito/embrión debido a la tensión superficial. Esto puede dañar al ovocito/embrión, o hacer que se pegue a la lámina, haciendo que sea difícil de remover durante la descongelación. Esto también puede aumentar el tiempo necesario en el TS, lo cual puede dañar al ovocito/embrión. **Para reiterar**, nuestro método no requiere que usted minimice el volumen de la gota. Si la gota es demasiado grande, o si dos o más ovocitos/embriones se colocan en una sola gota, simplemente vuelva a aspirarlos en la pipeta y coloque una nueva gota en un lugar diferente de la lámina.

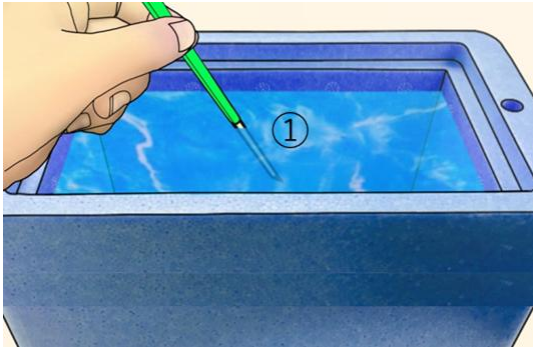
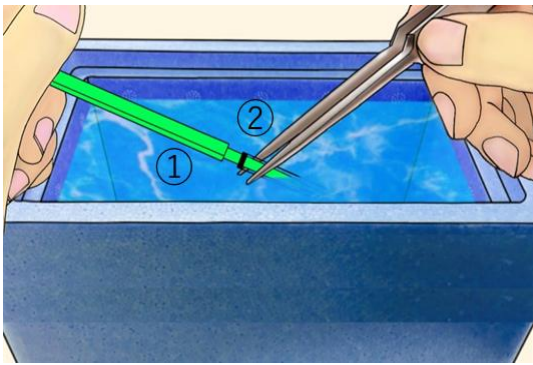
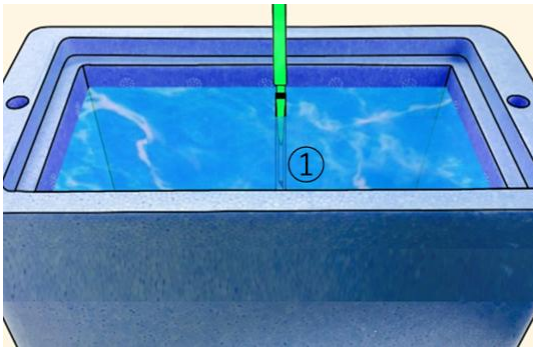
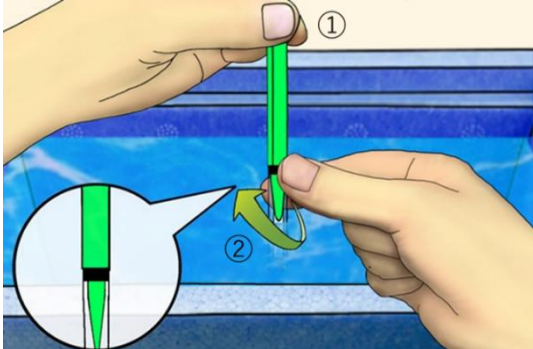
## Congelación Ultra-rápida

5



1. Después de confirmar la presencia del ovocito/embrión en la gota sobre la lámina, coloque inmediatamente el Cryotech en el nitrógeno líquido y agite suavemente hasta que dejen de aparecer burbujas. Esto elevará la tasa de enfriamiento (congelación ultra-rápida) (①).

## Fijación de la Tapa

	Figura	Procedimiento
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Mantenga la porción de la lámina dentro del nitrógeno líquido (①).</u></li> </ol>
2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque la tapa dentro del nitrógeno líquido. Después de unos segundos asegúrese de que no salgan más burbujas de la tapa. Coloque suavemente la tapa en el Cryotec.</li> <li>2. <u>Mantenga la punta de la lámina siempre dentro del nitrógeno líquido (①)</u> y utilice sus pinzas para colocarla cerca de la apertura de la tapa protectora (use la marca negra como guía) (②).</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Después de utilizar las pinzas para colocar la tapa, sostenga verticalmente el Cryotec (①).</li> </ol>
4		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mantenga la punta de la lámina en el nitrógeno líquido (①), levante levemente el Cryotec, luego firmemente gire y apriete la tapa con sus dedos (②).</li> </ol>

**VERIFICAR:** NO SOSTENGA la tapa protectora con pinzas por la parte media ya que puede romperse.

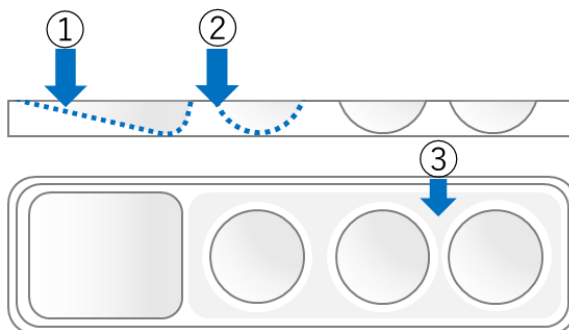
### 3. Protocolo de calentamiento

#### Temperaturas con riesgo de formar cristales de hielo

El proceso de descongelación es la etapa donde existe mayor probabilidad de formación de cristales de hielo. Incluso con un aumento de la tasa de enfriamiento durante la vitrificación, los cristales de hielo todavía se pueden formar si la tasa de calentamiento es demasiado baja. Es muy importante pasar rápidamente de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que es el rango en el que los cristales de hielo son más propensos a formarse.

#### [Materiales]

- **Cryotech® Kit de Calentamiento 102**
  - Solución de Descongelación (TS) 1.8 ml/vial×1
  - Solución Diluyente (DS) 0.5 ml/vial×1
  - Solución de lavado (WS) 1.0 ml/vial×1
  - 1 Placa de calentamiento con 4 pocillos (y su cubierta)
- **Microscopio (con la platina de calentamiento apagada)**
- **Temporizador (con función de conteo)**
- **Pinzas**
- **Micropipeta (con capacidad para 300µl)**
- **Pipeta Pasteur (con boquilla) o Stripper (con puntas)**
- **Contenedor de nitrógeno líquido**



#### Características especiales de la placa de descongelación

Nuestra placa de calentamiento, diseñada exclusivamente para su uso con el método Cryotec, cuenta con ① un pocillo rectangular inclinado para el uso de TS. También incluye ② pocillos hemisféricos y ③ el espacio para depositar la solución expulsada durante los lavados, similar a la placa de Vitrificación. La pendiente del pocillo TS está diseñada para permitir la colocación estable de la lámina del Cryotec. Los pocillos hemisféricos facilitan la formación de una capa de solución durante la dilución y permiten cambios graduales de la presión osmótica.

#### [Preparación para el Calentamiento]

1. Use una incubadora para calentar la Placa de Calentamiento y el vial de TS (con tapas cerradas) a  $37^{\circ}\text{C}$  al menos 2 horas antes de comenzar el proceso de descongelación (es aceptable que se deje calentando durante la noche).
  - Cuando utilice una incubadora de  $\text{CO}_2$ , asegúrese de que las tapas de los viales de TS estén totalmente cerradas antes de introducirlos a la incubadora.
2. Mantenga el DS y WS a temperatura ambiente ( $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ :  $25-27^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 2 horas antes del descongelamiento.
3. Prepare el nitrógeno líquido en el contenedor. Retire el Cryotec del tanque de nitrógeno líquido y colóquelo en el contenedor de nitrógeno. Sin sacar el Cryotec del nitrógeno, retire la tapa del Cryotec y colóquelo vertical contra la pared interior del contenedor de nitrógeno.

## [PASO 4]

### Calentamiento en el TS (1 minuto)

	Figura	Procedimiento
1		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que la Placa de Calentamiento haya alcanzado 37°C. Retírela de la incubadora y coloque 300 µl de DS a temperatura ambiente en el segundo pocillo (el primer pocillo redondo) (①).</li> </ol>

#### VERIFICAR:

Con el fin de garantizar la temperatura máxima de 37°C, es mejor que todas las soluciones a temperatura ambiente se coloquen inmediatamente antes de que sean utilizadas (ya que se reduciría la temperatura total de la Placa de Calentamiento). Sin embargo, debido a que el primer paso sólo toma 1 minuto, no hay suficiente tiempo para hacerlo, por ello el DS se coloca por adelantado.

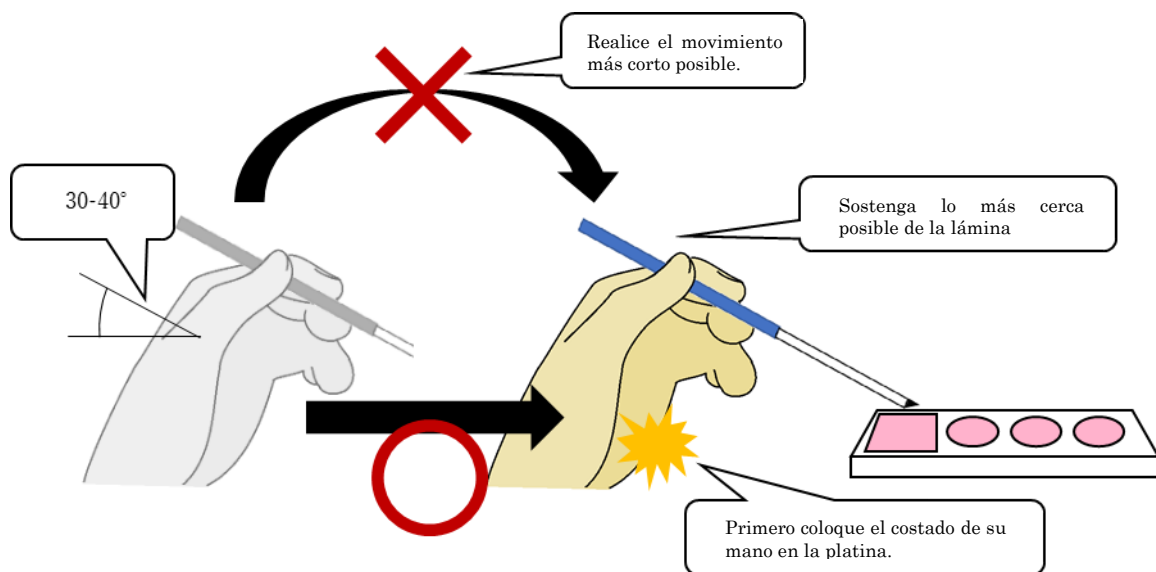
2		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Retire el vial de TS (1.8 ml) que previamente se calentó a 37°C en la incubadora y vierta su totalidad en el pocillo TS (pocillo rectangular) (②).</li> <li>2. Enfoque el microscopio al fondo del pocillo de TS (específicamente en la posición donde la lámina de Cryotec quedará al ser introducido; línea punteada de la izquierda) (③).</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Introduzca inmediatamente el Cryotec desde el nitrógeno líquido en el TS (en 1 segundo) (①).</li> <li>2. Inicie el cronómetro y espere <b>1 minuto</b> sin mover el Cryotec.</li> <li>3. Durante el calentamiento el ovocito/embrión se separará y se alejará del Cryotec (②).</li> </ol>

#### VERIFICAR: ¡Asegúrese de dejar que repose durante un minuto completo!

Al sumergir el Cryotec en el TS, manténgalo inmóvil durante un minuto completo. Si lo mueve, puede alterar el equilibrio de temperatura de toda la solución debido a la temperatura extremadamente baja del Cryotec. Además, si el ovocito/embrión se ha desprendido de la lámina, cualquier movimiento puede desplazarlo y hacer que lo pierda de vista. Si no puede ver al ovocito/embrión en la lámina de Cryotec, sea paciente y no intente mover la lámina antes de completar el minuto.

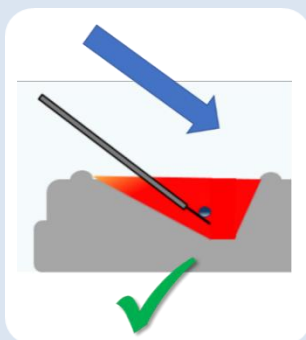
## Consejos para sumergir el Cryotec en el pocillo de TS

Prepare la pipeta con la mano derecha y sujete el Cryotec con la mano izquierda lo más cerca posible de la lámina. Introduzca el Cryotec inmediatamente en un ángulo de 30 a 40°, usando el ángulo del pocillo de TS como guía. Ésto puede hacer que su mano se arquee inconscientemente, por lo que es importante hacer un esfuerzo para mover su mano en línea recta. También puede colocar primero el costado de la mano en la platina, lo que la mantendrá más estable al sumergir el Cryotec. Asegúrese de mover rápidamente su mano desde el nitrógeno líquido hasta el área del microscopio, luego cuidadosa y suavemente inserte la lámina de Cryotec en el pocillo con TS. Mantenga la mayor distancia posible entre el nitrógeno líquido y el TS, para evitar la introducción de nitrógeno líquido en la solución. Si se forman burbujas de aire en la lámina, puede ser más difícil encontrar el ovocito/embrión, o éste puede adherirse a una burbuja y moverse dentro de la solución. Por favor, tenga toda la precaución necesaria.

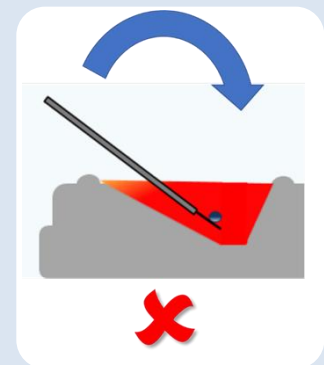


## Formación de burbujas al introducir a TS

Esto sucede cuando introducimos el Cryotec haciendo un movimiento perpendicular a la superficie del TS. Al hacer este movimiento, la superficie expuesta de la lámina es muy grande e introduce consigo aire en el TS, lo que causará la formación de burbujas. Para evitar este problema, hay que cambiar el movimiento que hacemos al introducir el Cryotec en el TS: favor de introducir en un movimiento diagonal, siguiendo el ángulo del pocillo de TS. Al hacer este movimiento, la superficie de la lámina expuesta será mucho menor y no traerá consigo aire hacia dentro del TS. Haga referencia a las siguientes imágenes: Tendemos a hacer este movimiento cuando trabajamos de prisa, por consiguiente, la introducción rápida dentro del TS



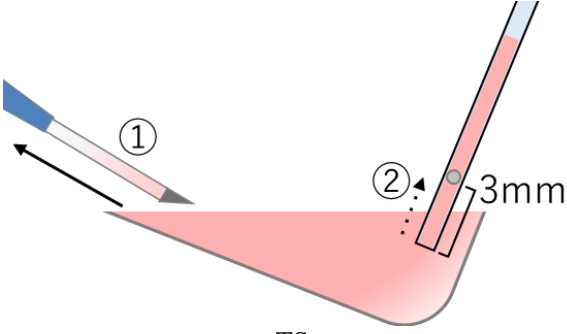
en un ángulo perpendicular traerá mucho aire y formará burbujas. El ovocito/embrión se pegará a las burbujas y será desplazado a otro lugar del pocillo y puede causar que se pierda. En caso de que esto suceda, revise la superficie del TS y en las partes de menor profundidad del pocillo. Ya que la acción capilar atraerá a las burbujas (con el ovocito/embrión) a la pared más cercana. Para solucionar este problema, introduzca en Cryotec con un movimiento en diagonal para evitar traer aire dentro del TS. Y por favor recuerde no perder de vista el óvulo/embrión por un minuto completo después de introducir el Cryotec en el TS, ya que les gusta escapar!!





## [PASO 5]

### Dilución en el DS (3 minutos)

	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">TS</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Deje el Cryotec inmóvil durante 1 minuto completo, a continuación, lentamente retírelo del pocillo de TS (①).</li> <li>2. Aspire el ovocito/embrión del TS, luego lentamente aspire 3 mm de TS en la pipeta (②).</li> </ol>

**VERIFICAR:**

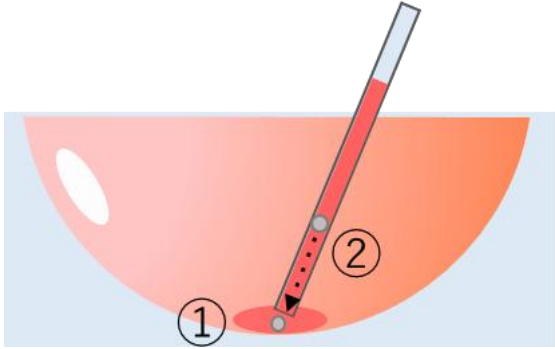
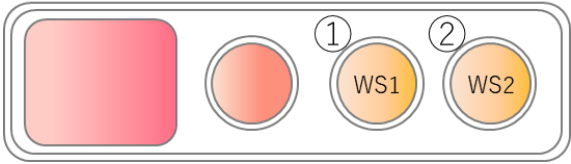
Si el ovocito/embrión todavía no se ha separado de la lámina después de un minuto, coloque la pipeta Pasteur debajo de ella y presione suavemente para separarla. Asegúrese de no tocar directamente el ovocito/embrión.

**VERIFICAR: Si el ovocito/embrión desaparece**

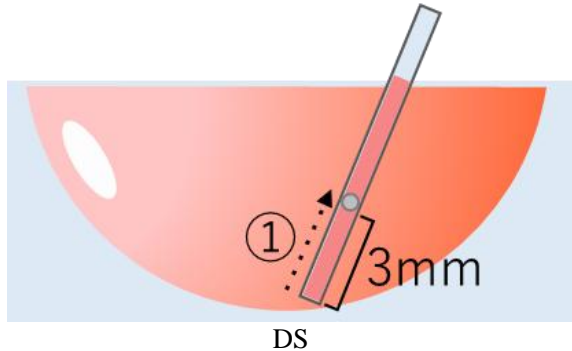
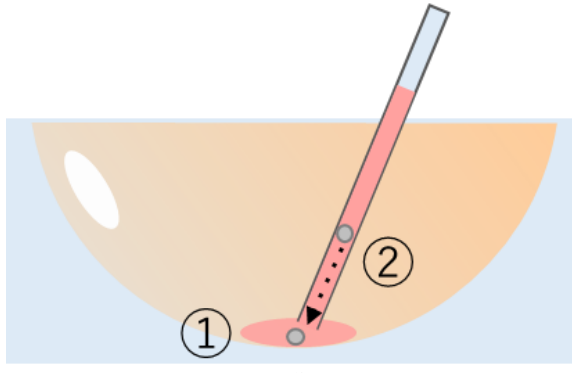
Si usted coloca con éxito el ovocito/embrión en la lámina de Cryotec durante el proceso de vitrificación, el ovocito/embrión ESTÁ dentro del pocillo de TS. Nuestra solución de TS tiene una toxicidad mínima, por lo que tendrá tiempo para buscar tranquilamente el ovocito/embrión.

**VERIFICAR:**

Puede medir 3 mm usando el indicador en la tapa de la Placa de Calentamiento.

2	 <p style="text-align: center;">DS</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inserte la punta de la pipeta al centro y hasta el fondo del DS y poco a poco expulse el TS para formar una capa de TS en el fondo (①).</li> <li>2. Coloque el ovocito/embrión suavemente en la parte inferior de la capa de TS (②).</li> <li>3. Apague la luz del microscopio y déjelo durante 3 minutos.</li> </ol>
3		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mientras espera 3 minutos, coloque 300 µl de WS en los pocillos WS1 y WS2 (① y ②).</li> </ol>

**Dilución en el WS1 (5 minutos)**

	<b>Figura</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>1</b>	 <p>DS</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. aspire el ovocito/embrión del DS, luego lentamente aspire 3 mm de DS en la pipeta (①).</li> </ol>
<b>2</b>	 <p>WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inserte la punta de la pipeta en el centro y hasta el fondo del pocillo de WS1 y poco a poco expulse el DS para formar una capa de DS al fondo (①).</li> <li>2. Coloque el ovocito/embrión suavemente en la parte inferior de la capa de DS (②).</li> <li>3. Después de iniciar el cronómetro, utilice el aumento grande para inspeccionar y memorizar cuidadosamente la forma detallada del ovocito/embrión. Apague la luz del microscopio y espere 5 minutos.</li> <li>4. Después de 5 minutos, compare la forma del ovocito/embrión con la forma que usted memorizó. Si confirma que el volumen del ovocito/embrión se ha recuperado completamente, o está próximo a hacerlo, esto indica que éste está vivo.</li> </ol>

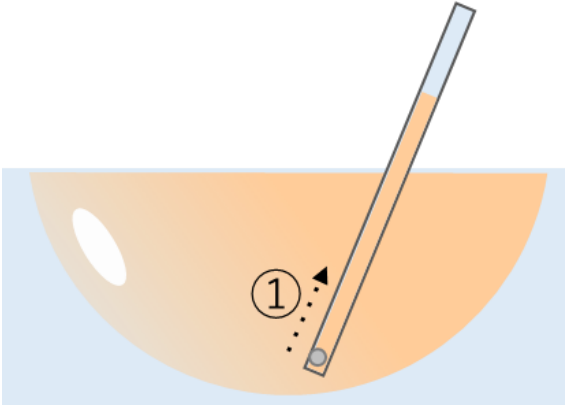
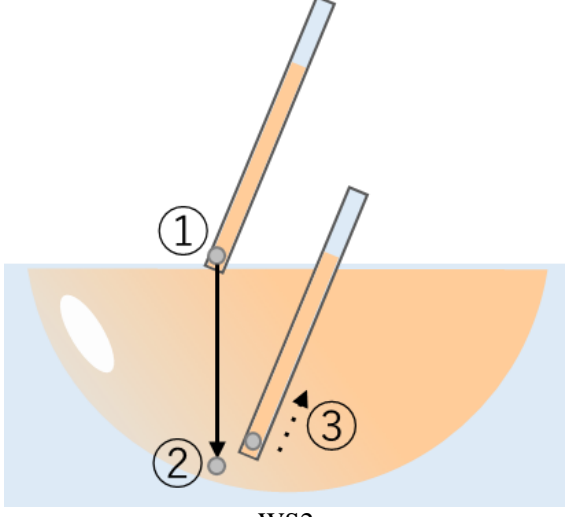
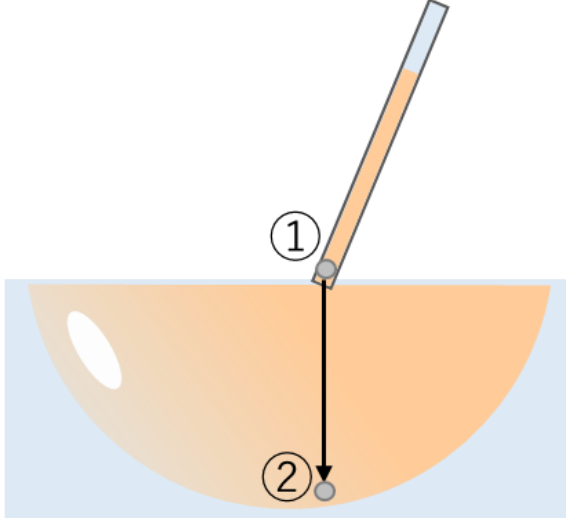
**VERIFICAR:**

Es importante confirmar durante este paso si el ovocito/embrión tuvo algún daño durante el proceso de vitrificación/descongelación. Un ovocito/embrión que ha sobrevivido tendrá una reacción normal de la membrana y recuperación del volumen.

La reacción durante esta etapa se debe a rehidratación: El ovocito/embrión se vuelve isotónico al entrar a WS (300) viniendo de DS (900). En otras palabras, mientras que el volumen de un ovocito/embrión sin ningún daño se recuperaría completamente, un ovocito/embrión de baja calidad necesitará más tiempo para hacerlo. En el caso de un ovocito/embrión muerto o dañado no sucedería la reacción normal de la membrana, por esta razón, usted no vería ningún cambio en el volumen. En el caso de los blastocistos, una vez que la cavidad del blastocisto se empieza a formar/expandir, o la cavidad del blastocisto está completamente reexpandida, se puede considerar que ha sobrevivido. En general, se ha demostrado que es probable que los embriones humanos se conviertan en embarazos si más del 30% de las blastómeras sobreviven:

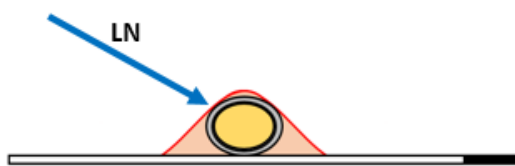
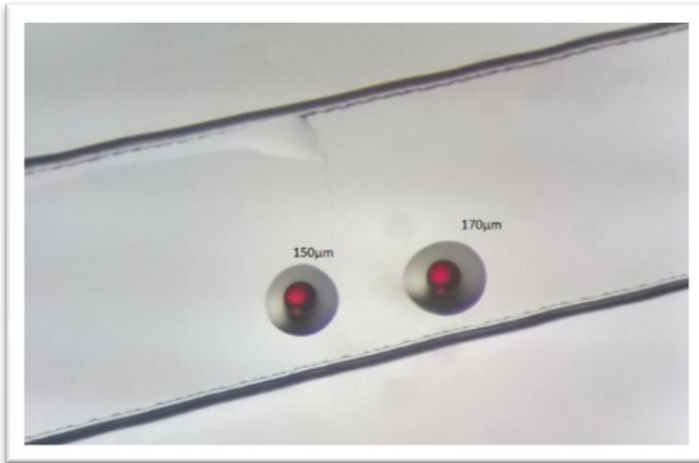
- Para un embrión en etapa de 2 células, 1 blastómera
- Para un embrión en etapa de 4 células, 2 blastómeras
- Para un embrión en etapa de 8 células, 3 blastómeras

## Lavado en el WS2 (1 minuto)

	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">WS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. aspire una pequeña cantidad de WS1 y al ovocito/embrión dentro de la pipeta (①).</li> </ol>
2	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque el ovocito/embrión en la superficie del lado izquierdo del pocillo de WS2 (①).</li> <li>2. El ovocito/embrión se hundirá lentamente hasta el fondo del pocillo (②).</li> <li>3. Después de que el ovocito/embrión llegue al fondo del pocillo, aspire una pequeña cantidad de WS2 y al ovocito/embrión en la pipeta (③).</li> </ol>
3	 <p style="text-align: center;">WS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque el ovocito/embrión en la superficie del lado derecho del pocillo de WS2 (①).</li> <li>2. El ovocito/embrión se hundirá lentamente hasta el fondo del pocillo una vez más (②).</li> <li>3. Una vez que el ovocito/embrión llegue al fondo del pocillo el lavado está completo.</li> <li>4. Transfiera el ovocito/embrión a la placa de cultivo para su recuperación hasta el momento del ICSI o transferencia embrionaria.</li> </ol>

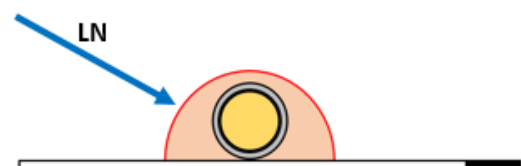
### VERIFICAR:

Se recomienda el cultivo del ovocito durante 2 horas para ICSI y del blastocisto durante al menos 1 hora antes de la transferencia embrionaria.



**A. Minimal volume**

- ✗ Oocyte/embryo loses its spherical shape
- ✗ Direct contact with LN
- ✗ Sample gets stuck to Cryotec



**B. Without minimizing volume**

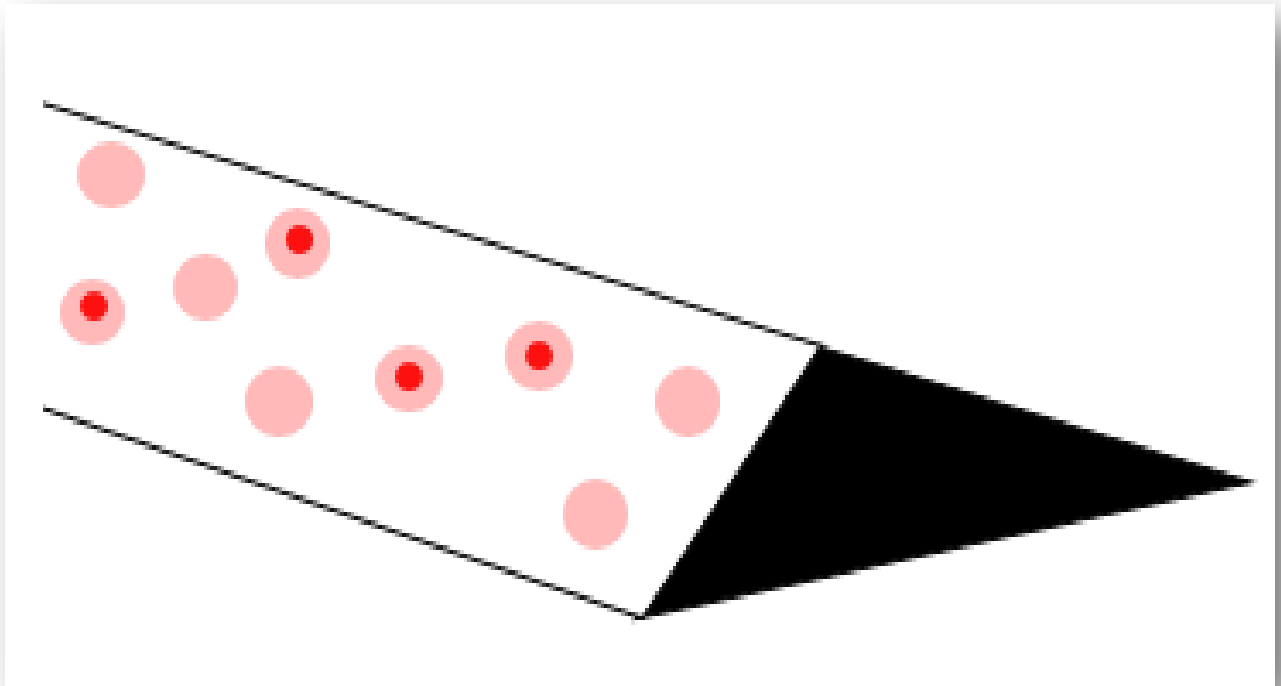
- ✓ Oocyte/embryo keeps its spherical shape
- ✓ Indirect contact with LN
- ✓ Sample comes off itself from the Cryotec

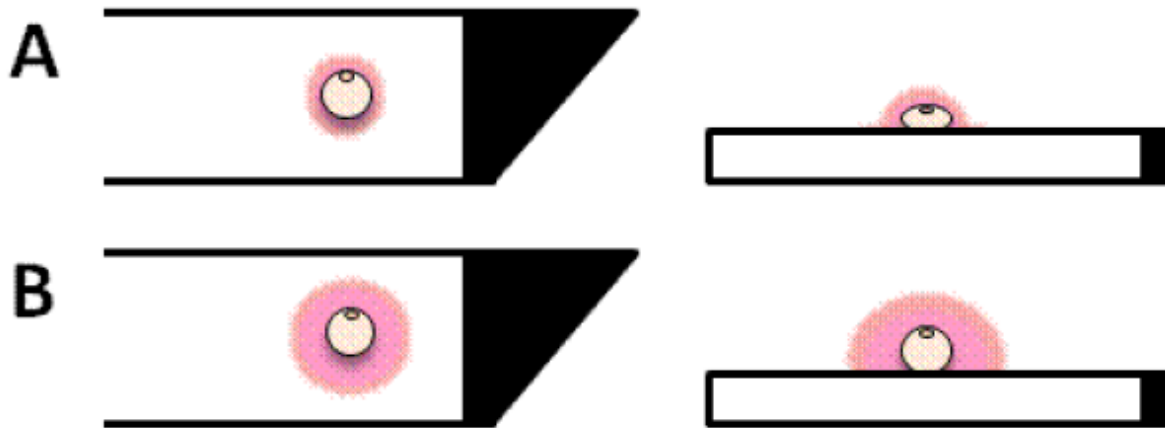


**A. Horizontal pipette.** It results in droplets of bigger volume and the shape is not spherical.

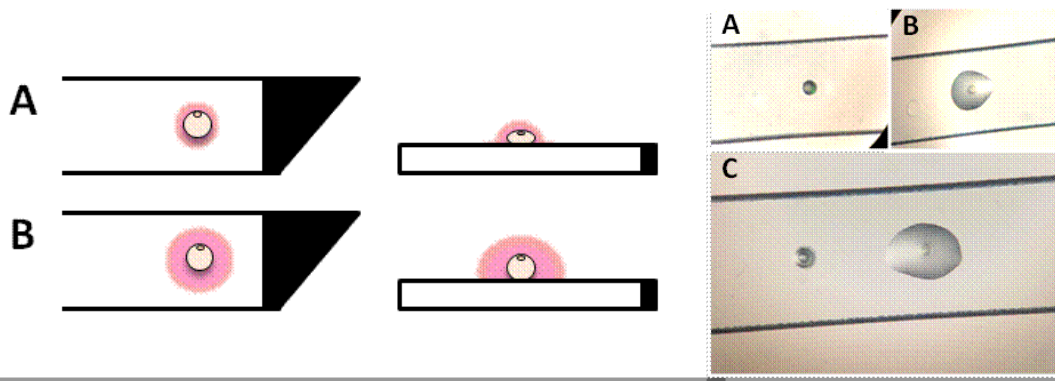
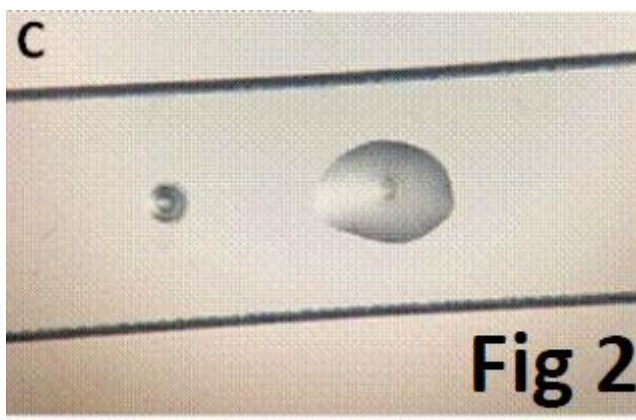


**B. Pipette perpendicular to the sheet.** It results in round droplets and with the optimal volume for vitrification.





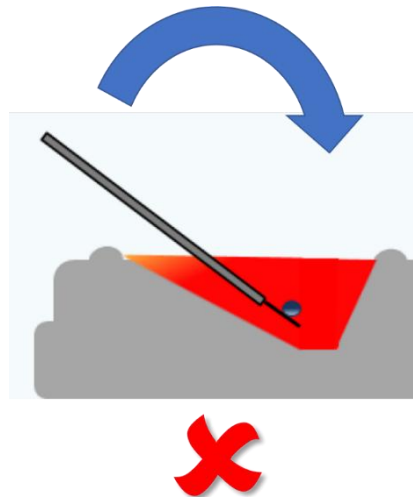
**Fig 1**



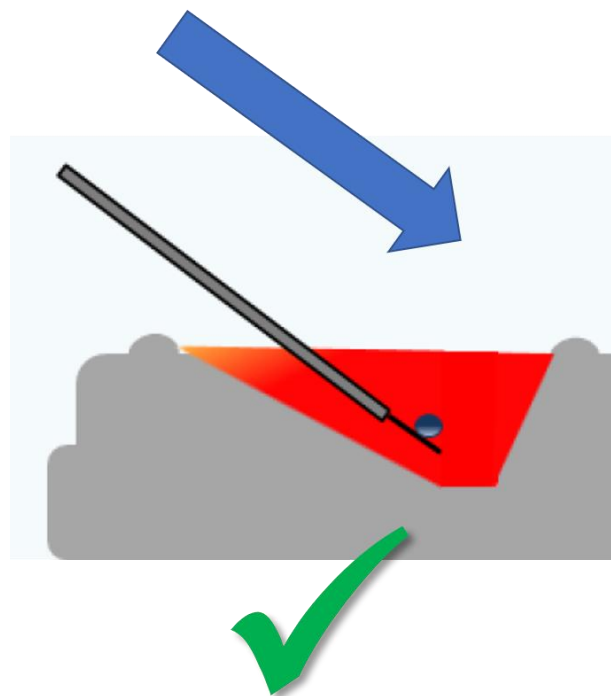
**1. Regarding the bubbles after plunging into TS**

This happens when we introduce the Cryotec doing a movement perpendicular to the surface of the TS. By doing this movement, the sheet surface exposed is too big and it will bring air inside the TS which will cause the bubble formation. To avoid this, we need to change the movement we do when we introduce the Cryotec into TS: please introduce it in a diagonal movement, following the angle of the TS well in the warming plate. By doing this movement, the exposed surface of the sheet will be much smaller, and it will not carry air into the TS.

Please refer to the following images:



We tend to do this movement when we are in rush, and the fast plunging into the TS in a perpendicular angle will bring a lot of air and make bubbles. And as you mention, the bubbles will attach to the oocyte/embryo and it will float and carry it away and make us lose it. In the case this happens, please search in the surface of the TS, and also search in the shallow part of the well, since the capillarity will attract the bubbles (with the sample) to the nearest wall.



To fix this problem, introduce the Cryotech in a diagonal movement to avoid introducing air into the TS. And please remember to keep an eye on your oocyte/embryo for one minute after introducing the Cryotech into TS because they like to run away!!