

# **EL MÉTODO CRYOTEC**

## Manual de uso

“Para Oocitos y Embriones”



## Vitrificación

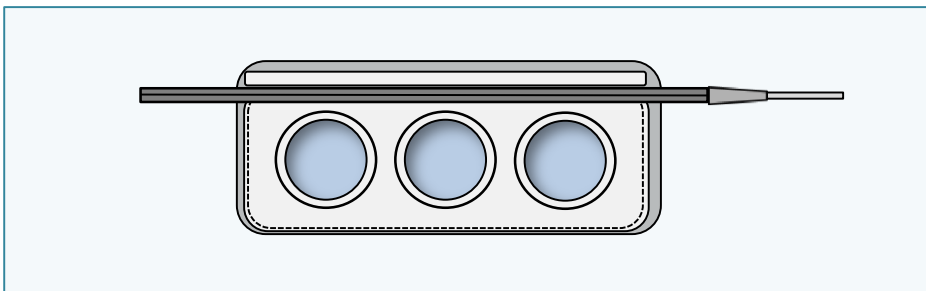
### **Materiales**

- **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

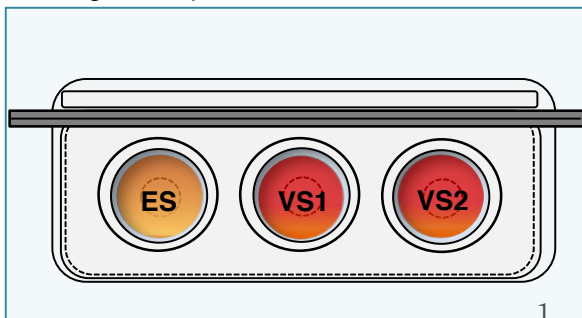
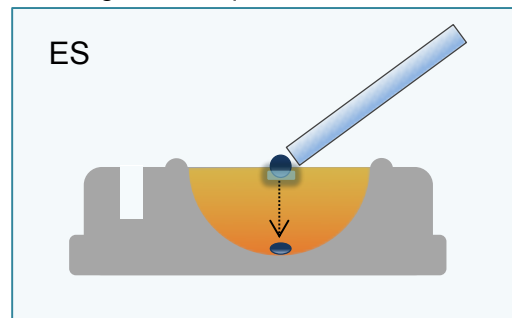


Fig. 3. ES Equilibramiento

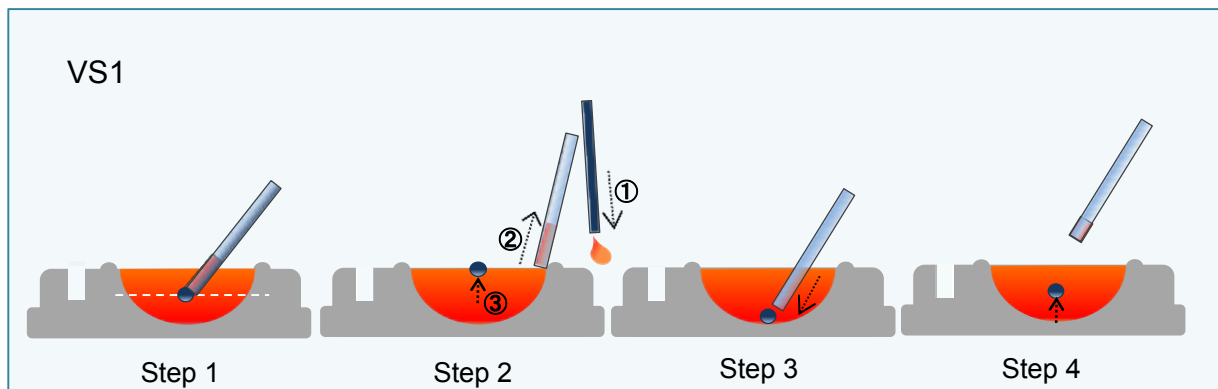


2. Aspire el oocito/embrión con la pipeta Pasteur con poco medio.
3. Coloque el oocito/embrión con poca cantidad de medio en la superficie del ES.  
Ponga en marcha el cronómetro. El oocito/embrión irá lentamente hacia el fondo del well, encogiéndose mientras se hunde, verá que aumenta el espacio perivitelino (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  $\mu\text{m}$  de diámetro), y 12 min para embriones de 4 -8 células.

### **Vitrificación 1 (30 - 40 seg)**

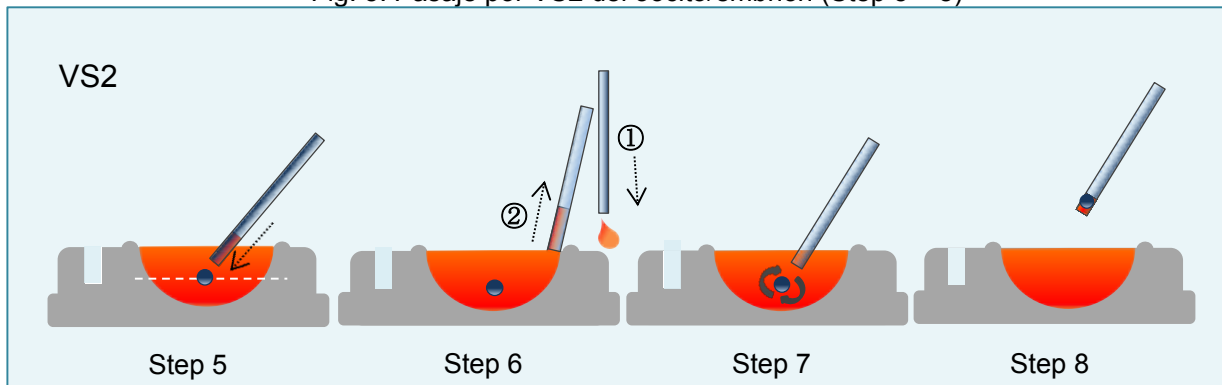
Fig. 4. Pasaje por VS1 del oocito/embrión (Step 1 – 4)



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.

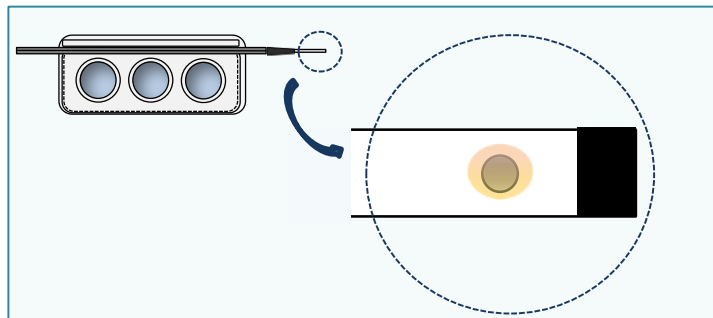
## Vitrificación 2 (10 – 20 seg)

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  $\mu\text{m}$  para Oocitos y Embriones de 4-8 células.
- 160~200  $\mu\text{m}$  para blastocistos.

### Nota 2

El mejor momento para vitrificar un blastocisto es cuando tiene un diámetro de entre 160~220  $\mu\text{m}$  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.

## Warming (Descongelamiento)

### **Materiales**

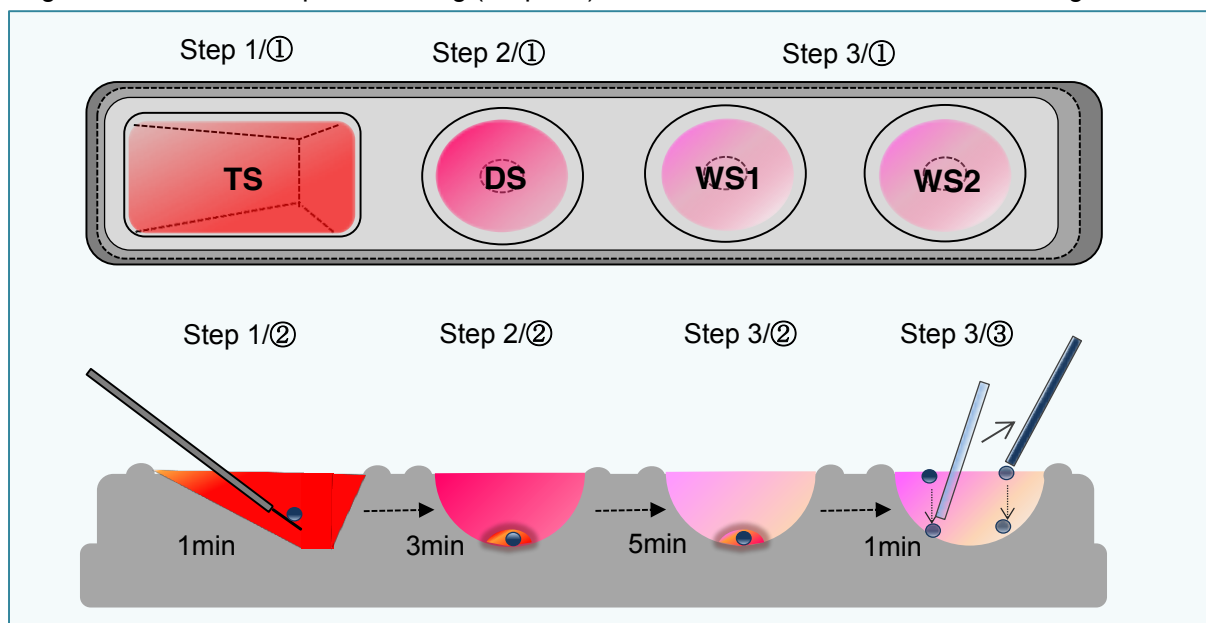
- **Cryotech Vitrification Kit**
  - Solución de Warming (TS): 1 vial de 1.8 ml
  - Solución de Dilución (DS): 1 vial de 0.5 ml
  - Solución de Lavado (WS): 1 vial de 1ml
  - 1 Placa de descongelamiento con 4 wells
- Lupa estereoscópica (Apague la platina térmica)
- Cronómetro
- Micro pipeta para 300µl

### **Preparación**

1. Ponga la Placa de descongelamiento y el vial TS (tapado) en la incubadora a 37°C >3 horas antes del procedimiento (se recomienda toda la noche).
2. Ponga el vial de DS y WS a temperatura ambiente (25~27°C) al menos 1 hora antes de usar.
3. Prepare el nitrógeno líquido.
4. Saque el contenedor del Cryotec del paciente y colóquelo en el nitrógeno líquido preparado para el procedimiento. Ponga el Cryotec dentro del recipiente con nitrógeno (en todo momento los Cryotecs debes estar sumergidos dentro del nitrógeno).
5. Saque la Placa de descongelamiento y el vial TS (tapado) de la incubadora, y llene el well rectangular con 1.8 ml de TS. (Fig. 7, Step 1/1).

Fig. 7. Procedimiento para warming (Step 1-3)

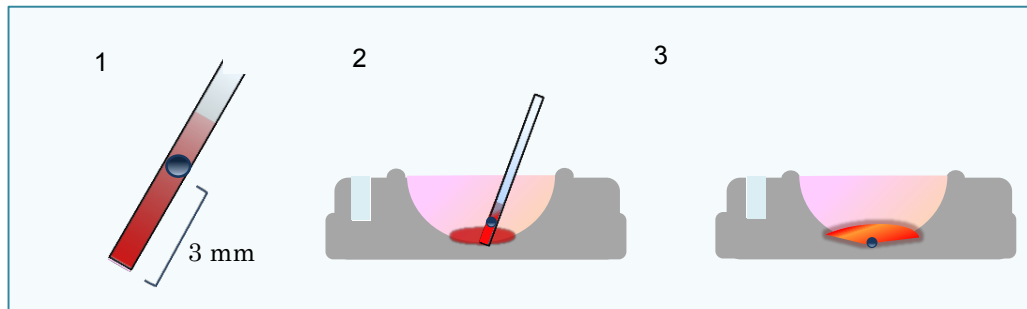
Placa de descongelamiento



### **Warming (1 min)**

1. Rápidamente (en 1 seg) coloque la lámina del Cryotec en el well de TS.  
Inicie el cronómetro. (Fig. 7, Step 1/2). Deberá estar en TS por 1 min.
2. El oocito/embrión se separará del Cryotec por si solo y estará libre en el medio.
3. Confirme la presencia del oocito/embrión en el well de TS.
4. Mientras espera, llene con 300 µl de solución Diluyente el well de DS (Fig.7, Step 2/2).

Fig. 8. Reemplazo gradual de las soluciones (TS→DS, DS→WS1)



### **Dilución (3 min)**

1. Aspire el oocito/embrión y 3 mm de TS dentro de la pipeta (Fig. 8, 1).
2. Expulse suavemente el contenido de la pipeta en el fondo y centro del DS (Fig. 8, 2), de manera que se forme una pequeña capa de TS en el fondo del well de DS (Fig. 8, 3). Esta es la forma más gradual de reemplazar el TS por DS.  
Espere 3 min (Fig. 7, Step 2/2).
3. Mientras espera llene con 300 µl de Solución de Lavado los well WS1 y WS2 (Fig. 7, Step 3/2-3).

### **Lavado 1 (5 min)**

4. Aspire el oocito/embrión y 3 mm de DS dentro de la pipeta (Fig. 8, 1).
5. Expulse suavemente el contenido de la pipeta en el fondo y centro del WS1 (Fig. 8, 2), de manera que se forme una pequeña capa de DS en el fondo del well de WS1 (Fig. 8, 3). Esta es la forma más gradual de reemplazar el DS por WS1.  
Espere 5 min (Fig. 7, Step3/2).
6. Evalúe la supervida al final de este paso determinando si el oocito/embrión se ha recuperado o no.  
Si se trata de un blastocisto pasarán 3 horas más para que recupere su blastocele.

### **Lavado 2 (1 min)**

7. Aspire el oocito/embrión con mínimo volumen de WS1.
8. Coloque el oocito/embrión en la superficie well WS2 (Fig. 7, Step3/3).
9. Cuando el oocito/embrión se hunda al fondo del well, aspirelo nuevamente y colóquelo en la superficie para que sea lavado en este medio 2 veces en total.
10. Finalmente lleve el oocito/embrión al su medio de cultivo para recuperación final e ICSI o ET.  
(Luego del warming, se recomiendan 2 a 4 horas de cultivo para oocitos y 3 horas para embriones).