



Ready to Use (RtU)

EL MÉTODO CRYOTEC



A todos quienes cuidan a los pacientes día a día

Reprolife se preocupa profundamente por los pacientes y sus valiosas vidas, y lo hace de una manera libre de estrés.

「Ready to Vitri Kit Cryotec」

「Ready to Warm Kit Cryotec」

Experimente la tecnología más avanzada.

Lista de contenido

1. Operación básica	• • • 4
Aumento del Microscopio	• • • 4
Posición del ovocito/embrión durante la manipulación	• • • 4
2. Protocolo de Vitrificación	• • • 5
Materiales	• • • 5
Preparación para la Vitrificación	• • • 5
[PASO 1] Equilibrio en el ES	• • • 6
[PASO 2] Equilibrio en el VS1	• • • 9
[PASO 3] Encogimiento en el VS2	• • • 12
[PASO 3] Montaje del ovocito/embrión	• • • 13
[PASO 3] Congelación ultra-rápida	• • • 13
[PASO 3] Colocación de la tapa	• • • 14
3. Protocolo de Descongelación	• • • 15
Materiales	• • • 15
Preparación para la descongelación	• • • 15
[PASO 4] Descongelación en el TS	• • • 16
[PASO 5] Dilución en el DS	• • • 18
[PASO 5] Dilución en el WS1	• • • 19
[PASO 6] Lavado en el WS2	• • • 20

1. Operación básica

[Aumento del Microscopio]

El microscopio utilizado en el método Cryotec debe presentar dos niveles de aumento para un funcionamiento sencillo.

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

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

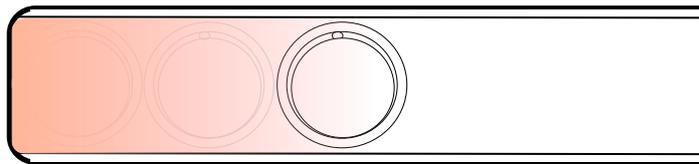
Aumento grande: Se utiliza para observar al ovocito/embrión (x45-55).

- Este aumento le permite verificar a detalle cada área.

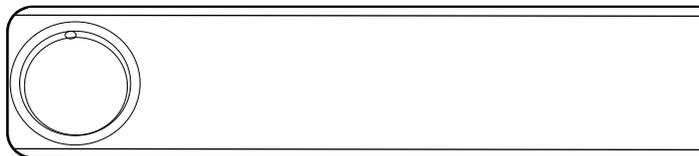
[Posición del ovocito/embrión durante la manipulación]

Al usar los protocolos del Método Cryotec solo necesita estar familiarizado con tres posiciones para el ovocito/embrión.

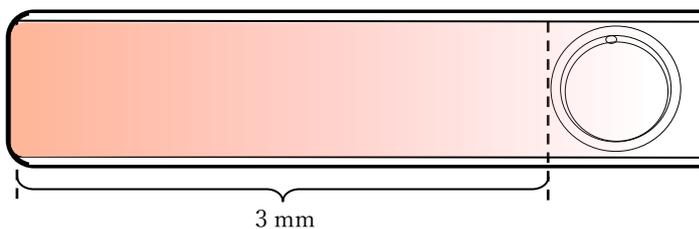
- ① Aspirar una pequeña cantidad de la solución (aproximadamente el doble del diámetro del ovocito) después del ovocito/embrión (procedimiento estándar).



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

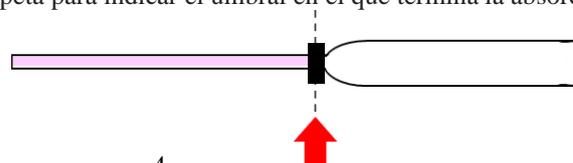


- ③ Aspirar 3 mm de solución después del ovocito/embrión (dilución mediante TS y DS).



Consejo:

Todas las acciones que involucran la pipeta y al ovocito/embrión pueden hacerse significativamente más sencillas usando la acción capilar (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.



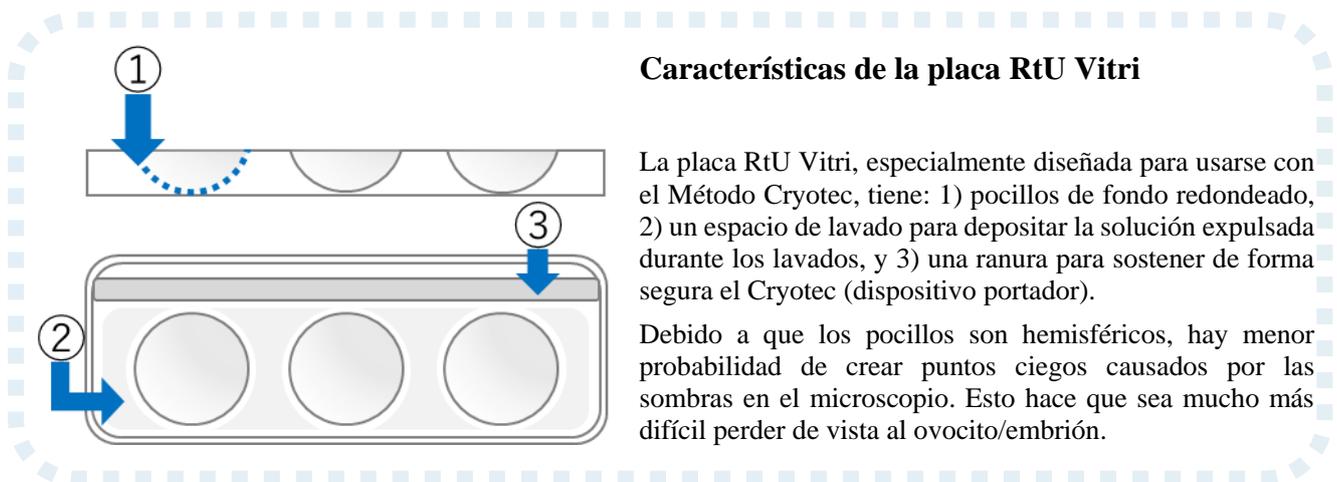
2. Protocolo de Vitrificación

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.

【Preparación】

- Ready to Vitri Kit Cryotec
- Dispositivo de vitrificación (Cryotec)
- Microscopio estereoscópico (con la platina de calentamiento apagada)
- Temporizador (con función de conteo)
- Pinzas
- Tijeras
- Herramienta para manipulación
- Contenedor de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido



【Preparación para la Vitrificación】

1. Mantenga la habitación a una temperatura ambiente entre 25°C y 27°C.
2. El Ready to Vitri Kit Cryotec debe estar a temperatura ambiente (26±1°C: 25-27°C) por lo menos 30 minutos antes.

¡Atención! Antes de usar, revise visualmente las soluciones en las placas por cualquier anomalía en color y temperatura.

3. Prepare la pipeta de manipulación con un diámetro interno adecuado para el ovocito/embrión que será vitrificado:
 - Para ovocitos/embriones, 140-150 µm.
 - Para blastocistos, 160-220 µm.

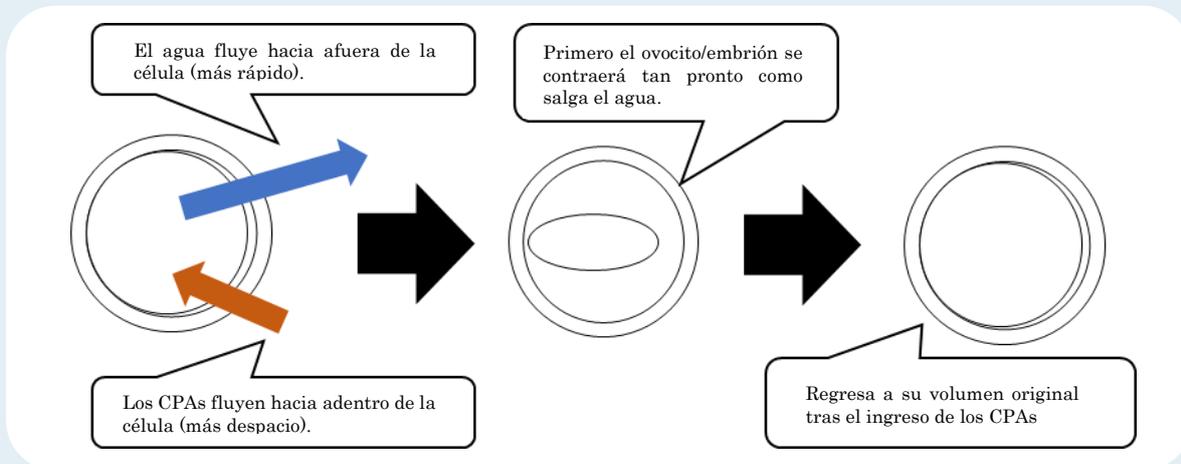
[PASO 1]

Equilibrio en el ES (7-13 minutos : a temperatura ambiente)

El propósito de este paso es introducir agentes crioprotectores (CPAs) en el interior de la célula, cuya finalización exitosa se confirma a través de la recuperación completa del volumen de la célula.

El mecanismo de la contracción y recuperación de las células

Debido a que en el interior de la célula hay 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, debido a que los CPAs pueden penetrar la membrana celular, éstos fluyen hacia dentro de 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.



Cómo retirar la cubierta

Para retirar la cubierta, sostenga firmemente la placa con una mano. Tenga cuidado de no tocar el interior de la placa con sus dedos. Con cuidado desprenda la cubierta poco a poco.

¡Atención! Para evitar que el medio salga, asegúrese de no hacer presión en el área de los pocillos al

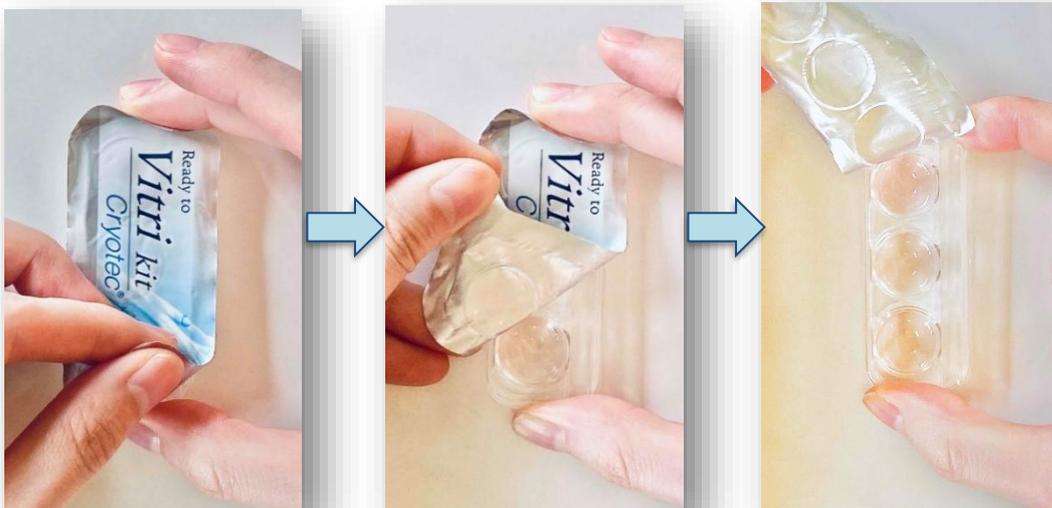
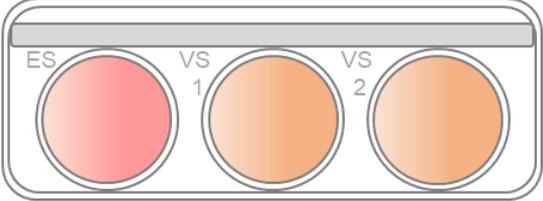
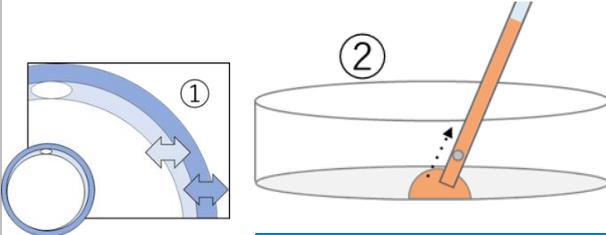
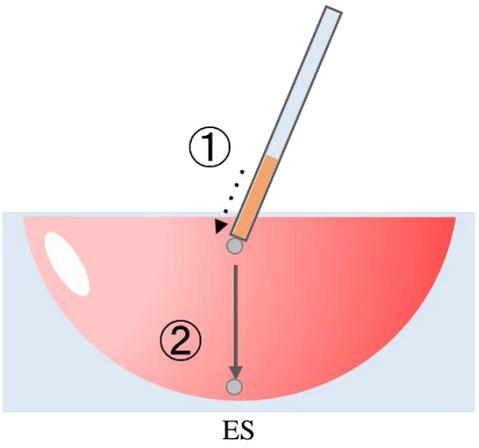
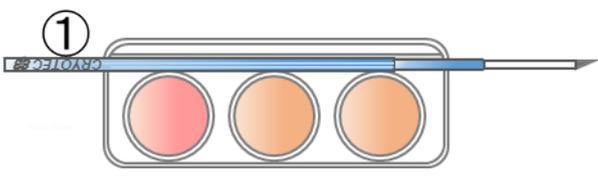


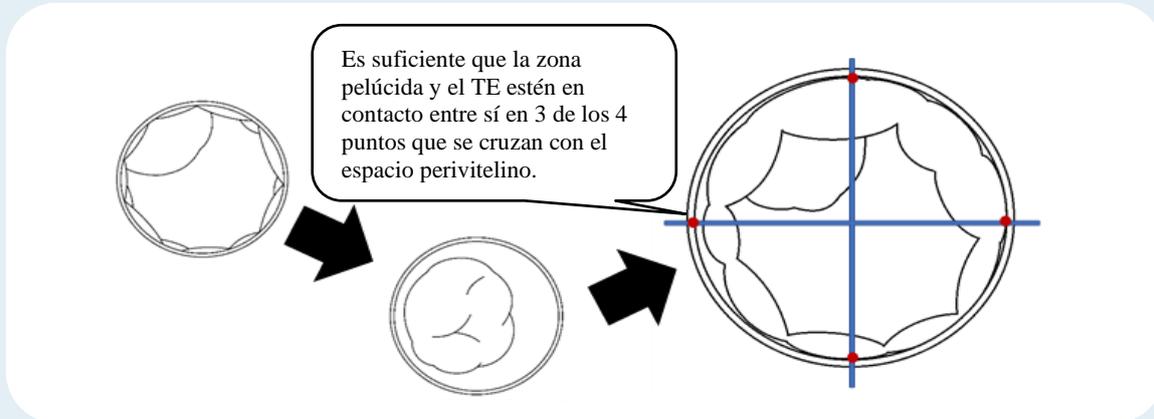
	Figura	Procedimiento
1		<ol style="list-style-type: none"> Con cuidado remueva la cubierta de la placa previamente llevada a temperatura ambiente.
2	 <p>Placa de cultivo</p>	<ol style="list-style-type: none"> Inspeccione y observe con detenimiento el ovocito/embrión con aumento grande, prestando especial atención al tamaño de la zona pelúcida en relación con el espacio perivitelino (en ovocitos) o la cavidad (en blastocistos) para confirmar que el ovocito/embrión haya recuperado totalmente su volumen original durante el equilibrio. Aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta junto con una pequeña cantidad de medio de cultivo (aproximadamente del tamaño de 2 ovocitos). (2).
3	 <p>ES</p>	<ol style="list-style-type: none"> Coloque el ovocito/embrión y el medio de cultivo que usted aspiró en paso 1-2-2 en el ES, directamente en el centro (1). Inicie el temporizador El ovocito/embrión se hundirá lentamente mientras se encoge (2). Espera hasta la recuperación completa de la forma original del ovocito/embrión, o muévelo a VS después del tiempo máximo de equilibrio (13 minutos para ovocitos y blastocistos, y 10 minutos para embriones divididos).
4	<h1>PASO 1</h1> 	<ol style="list-style-type: none"> Mientras espera la recuperación del volumen, retire el Cryotec de la protección plástica. Escriba 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, con el logotipo de Cryotec mirando hacia arriba (1). Prepare el nitrógeno líquido fresco en el contenedor. Una vez que el ovocito/embrión haya recuperado completamente su tamaño original, el equilibrio en ES estará completo.

VERIFICAR: Puede utilizar la tapa para la placa incluida en el kit mientras el Cryotec está en la ranura.

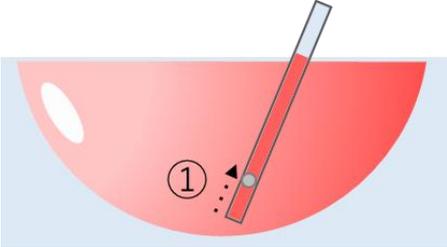
VERIFICAR: Asegúrese de que el Cryotec esté en buenas condiciones antes de utilizarlo.

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 μm -220 μm de diámetro) – 13 minutos; embriones en fase de 4-8 células – 10 minutos. Se ha determinado que se produce un equilibrio suficiente después de 13 o 10 minutos, respectivamente.



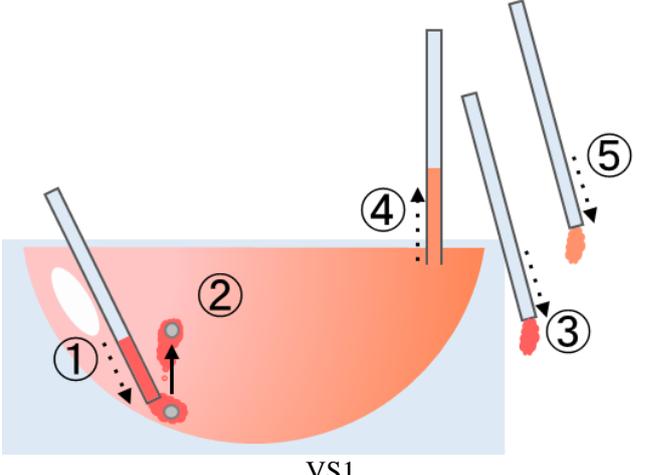
Algunas veces puede ser difícil determinar si el volumen de un blastocisto se ha recuperado completamente debido a la cavidad que presenta. Por lo tanto, en el caso de los blastocistos, inspeccione el contacto entre la zona pelúcida y el TE como se muestra en la figura de arriba y determine la recuperación.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

<p>5</p>	 <p>ES</p>	<p>1. Aspire el ovocito/embrión con una pequeña cantidad de ES (aproximadamente el tamaño de 2 ovocitos) (①).</p>
----------	---	---

[PASO 2]

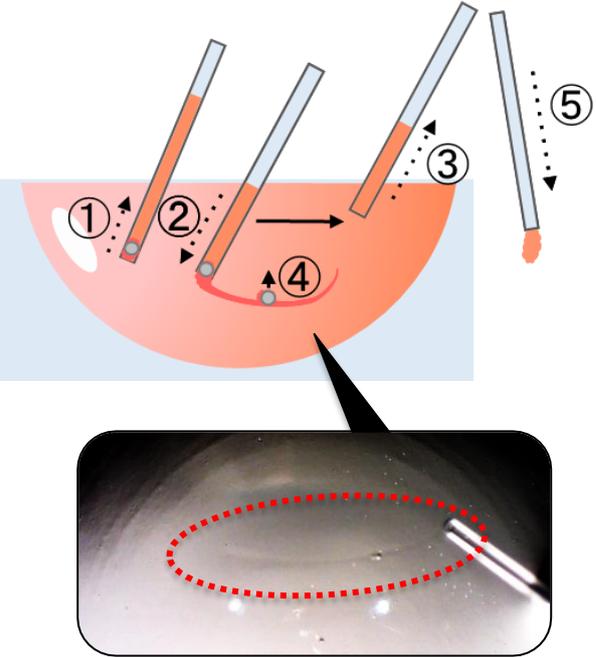
Equilibrio en el VS1 (30-60 segundos)

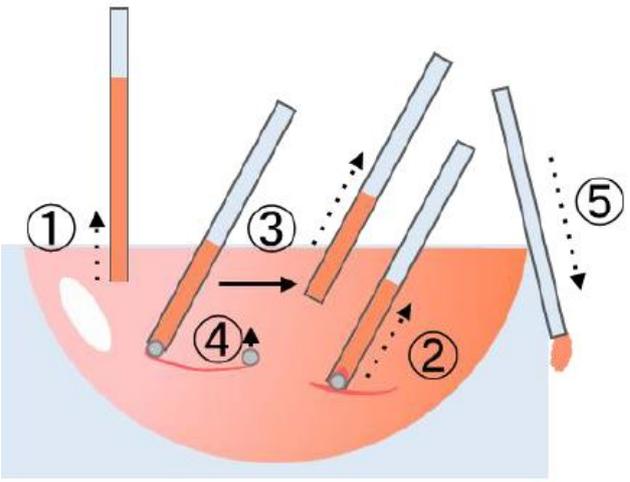
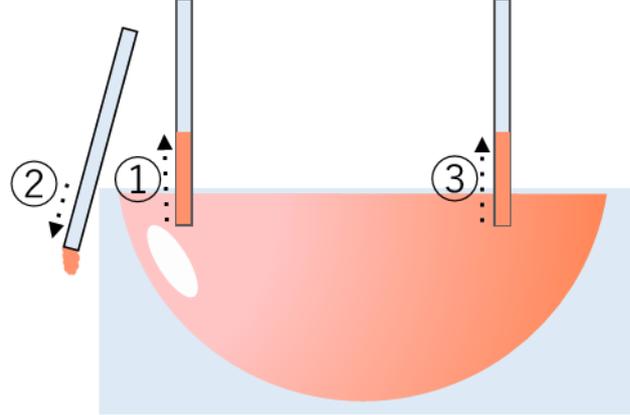
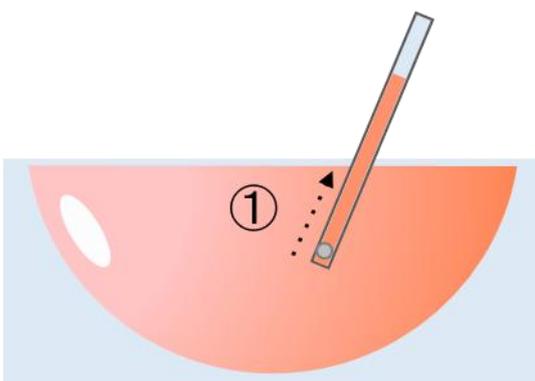
El propósito de VS1 es reemplazar todo el ES extracelular con VS. El ovocito/embrión es movido horizontal y verticalmente, y el final de este paso se determina cuando la densidad de la célula y del VS1 es la misma.

	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque el ovocito/embrión al fondo del pocillo de VS1 (①), luego retire la pipeta lentamente. 2. El ovocito/embrión está rodeado de ES, así que se elevará levemente (②). 3. Una vez que confirme que el ovocito/embrión haya flotado, deseche todo el ES de la pipeta en el espacio entre los pocillos de la placa (③). Aspire VS1 limpio del borde del pocillo y deséchelo fuera del pocillo (④, ⑤).

VERIFICAR:

Debido a la alta viscosidad de las soluciones, los embriones se elevarán muy poco y será fácil observarlos.

2	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Después de aspirar VS1 limpio del borde del pocillo, aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (①). 2. Para poder remover completamente el ES restante, coloque la pipeta a media profundidad del VS1 y suelte el ovocito/embrión con un movimiento horizontal mientras expulsa el medio. Saque un poco más de medio después del ovocito/embrión siguiendo el mismo movimiento, luego retire la pipeta. (② y ③). 3. El ovocito/embrión se eleva naturalmente y se separa levemente del medio expulsado (④). 4. Lave la pipeta (⑤).
---	--	---

<p>3</p>	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Repita el proceso del paso anterior para promover una mayor deshidratación. Después de aspirar VS1 limpio del borde del pocillo (①), tome el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (②). 2. Similar al paso 2-2, coloque la pipeta en un área limpia a profundidad media del VS1. Expulse medio mientras realiza un movimiento horizontal y suelte el ovocito/embrión durante el movimiento (③). 3. Observe el ovocito/embrión con el mayor aumento. El intercambio de soluciones de ES a VS puede ser confirmado al observar encogimiento y sin cambio de enfoque (④). 4. Expulse todo el contenido de VS1 restante en la pipeta en el espacio entre pocillos (⑤).
<p>4</p>	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. aspire y expulse VS2 limpio del borde del pocillo de VS2 (① y ②). 2. aspire VS2 limpio una vez más del borde del pocillo de VS2 (③).
<p>5</p>	 <p style="text-align: center;">VS1</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. aspire el ovocito/embrión en el VS1 en la punta de la pipeta (①).

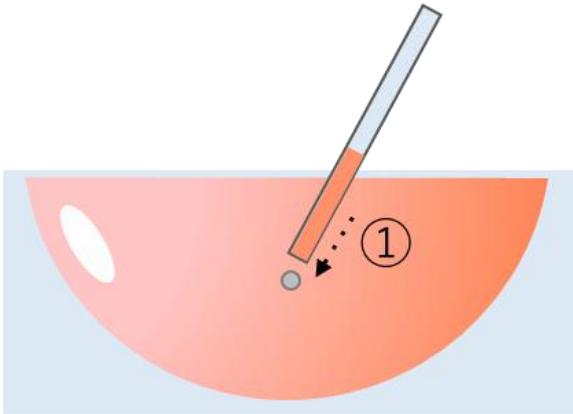
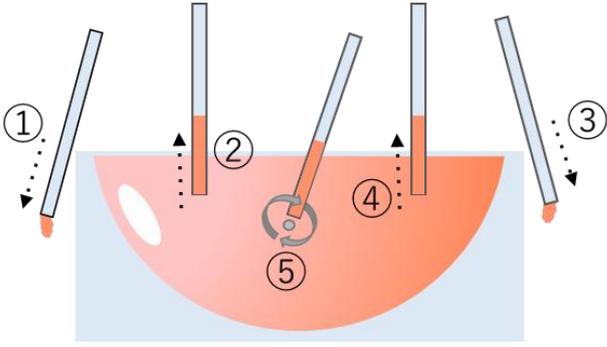
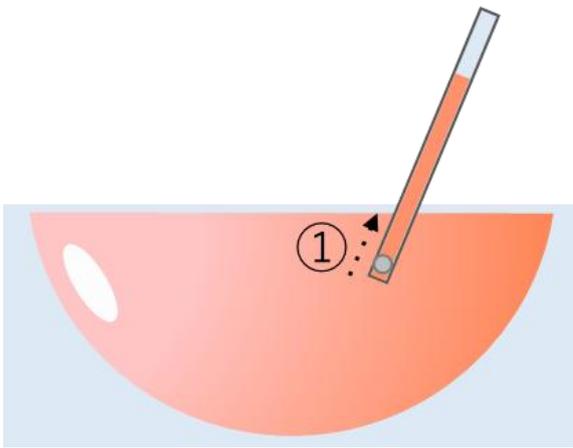
VERIFICAR:

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

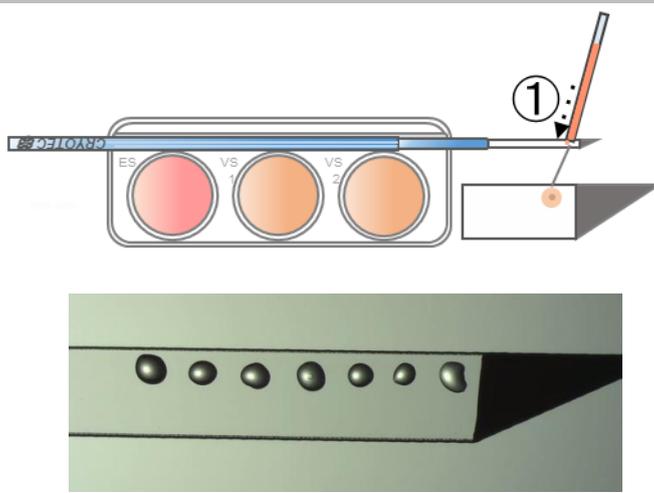
[PASO 3]

Encogimiento en el VS2 (10-20 segundos)

El propósito del VS2 es confirmar que el ES ha sido reemplazado completamente por VS, lo cual se determina con el encogimiento de las células.

	Figura	Procedimiento
1	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>1. Coloque el ovocito/embrión en la parte central del pocillo de VS2 (①).</p>
2	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>1. Expulse el VS1 restante de la pipeta en el espacio de lavado entre pocillos (①). aspire y deseche VS2 limpio del borde del pocillo (② y ③).</p> <p>2. Aspire VS2 limpio una vez más (④).</p> <p>3. Agite la solución alrededor del ovocito/embrión 5 veces para observarlo desde múltiples ángulos con el fin de confirmar que está completamente encogido (⑤).</p>
3	 <p style="text-align: center;">VS2</p>	<p>1. Aspire el ovocito/embrión en la punta de la pipeta (①).</p>

Montaje del ovocito/embrión

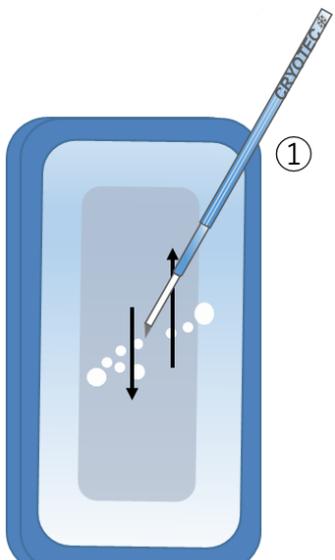
4		<p>1. Coloque el ovocito/embrión y una pequeña cantidad de VS2 cerca del marcador (triángulo negro) de la lámina Cryotec (①).</p>
---	---	---

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

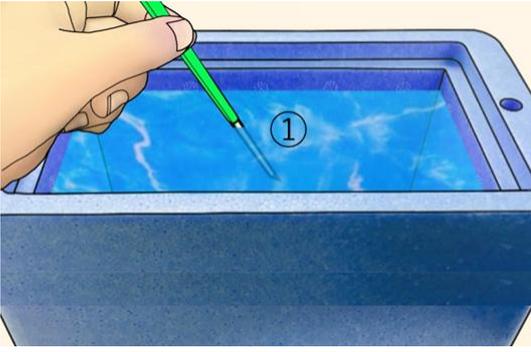
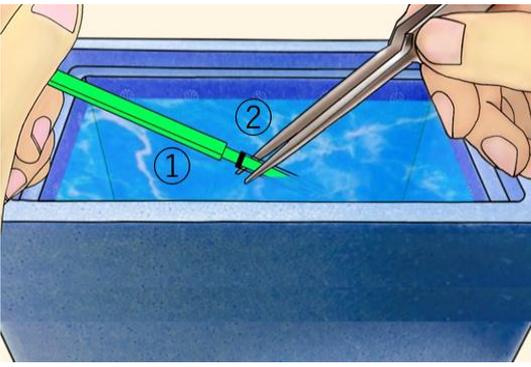
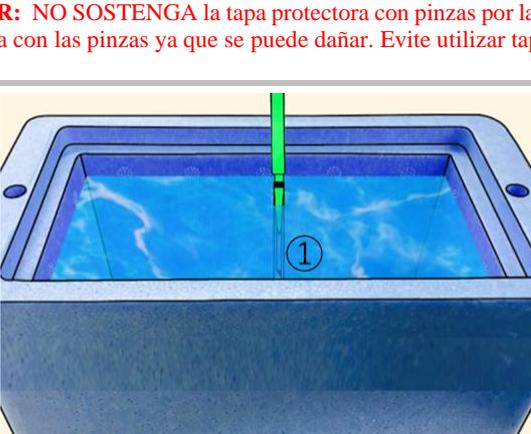
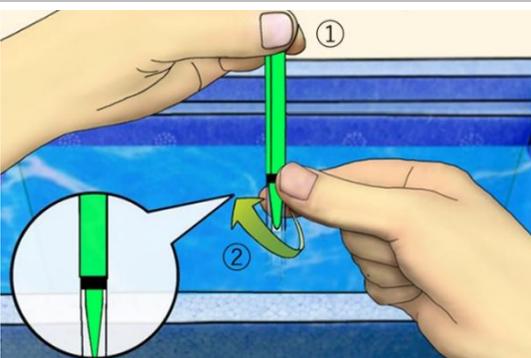
No intente reducir el volumen de la gota

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 Cryotec 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	 <p style="text-align: center;">Nitrógeno líquido (LN₂)</p>	<p>1. Después de confirmar la presencia del ovocito/embrión en la gota sobre la lámina, coloque inmediatamente el Cryotec en el nitrógeno líquido y agite suavemente hasta que dejen de aparecer burbujas. Esto elevará la tasa de enfriamiento (congelación ultra-rápida) (①).</p>
---	---	---

Colocación de la Tapa

	Figura	Procedimiento
1		<p>1. Mantenga la porción de la lámina dentro del nitrógeno líquido (①).</p>
2		<p>1. Coloque la tapa dentro del nitrógeno líquido. Después de unos segundos asegúrese de que no salgan más burbujas de la tapa.</p> <p>2. Mantenga la punta de la lámina siempre dentro del nitrógeno líquido (①) y utilice sus pinzas para colocarla cerca de la parte superior (marca negra) de la tapa protectora. Inserte la tapa sobre el Cryotec (②).</p>
3		<p>1. Después de utilizar las pinzas para colocar la tapa, posicione el Cryotec de forma vertical (①).</p>
4		<p>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).</p>

VERIFICAR: NO SOSTENGA la tapa protectora con pinzas por la parte media ya que puede romperse ni trate de asegurarla aplicando mucha fuerza con las pinzas ya que se puede dañar. Evite utilizar tapas protectoras rotas o dañadas.

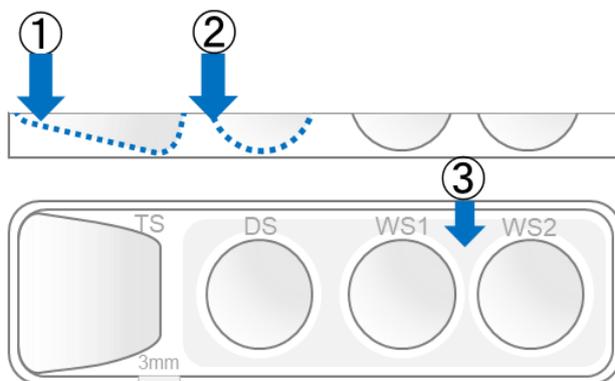
3. Protocolo de Descongelación

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°C a -20°C , que es el rango en el que los cristales de hielo son más propensos a formarse.

【Preparación】

- Ready to Warm Kit Cryotec
- Microscopio estereoscópico (con la platina de calentamiento apagada)
- Temporizador (con función de conteo)
- Pinzas
- Herramienta para manipulación
- Contenedor de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido



Características de la placa RtU Warm

Nuestra placa RtU Warm, diseñada para su uso exclusivo con el Método Cryotec, cuenta con ① un pocillo trapezoidal con una inclinación en el fondo para el TS. También incluye ② pocillos hemisféricos y ③ espacio para depositar la solución expulsada durante los lavados, similar a la placa RtU Vitri. 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 presión osmótica.

【Preparación para la Descongelación】

1. Caliente la placa RtU Warm a 37°C en una incubadora, al menos 30 minutos antes del procedimiento (también es aceptable dejarla desde la noche anterior).
2. Prepare el nitrógeno líquido en el contenedor.
3. 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.

VERIFICAR: No presione con mucha fuerza la tapa protectora con las pinzas al intentar quitarla ya que la tapa y la lámina del Cryotec se pueden dañar.

[PASO 4]

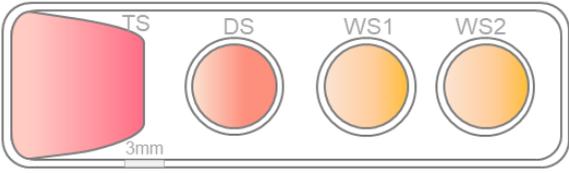
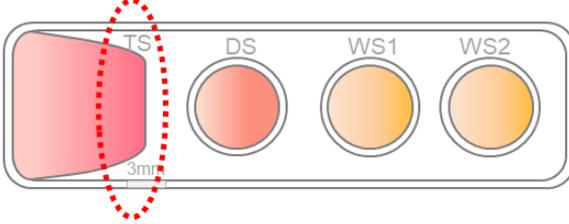
Descongelación en el TS (1 minuto)

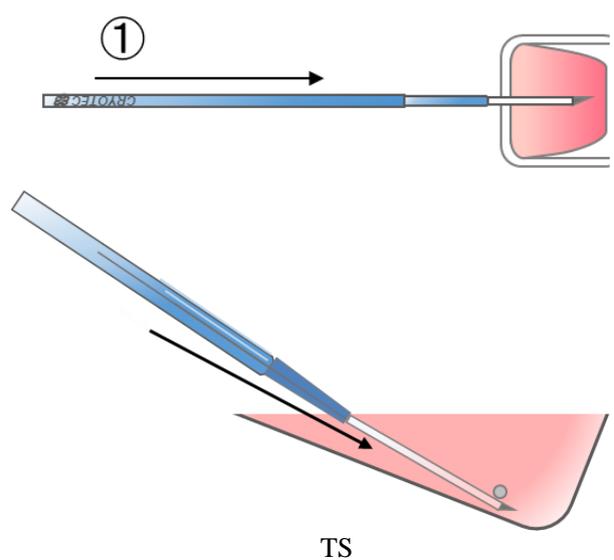
Cómo retirar la cubierta

Para retirar la cubierta, sostenga firmemente la placa con una mano. Primero, abra un poco para dejar entrar aire al pocillo de TS. Tenga cuidado de no tocar el interior de la placa con sus dedos. Con cuidado despegue la cubierta poco a poco.

¡Atención! Para evitar que el medio salga, asegúrese de no hacer presión en el área de los pocillos al momento de retirar la cubierta.



	Figura	Procedimiento
1		1. Retire cuidadosamente la cubierta de la placa RtU Warm después de haberla calentado en una incubadora a 37°C.
2		1. 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).

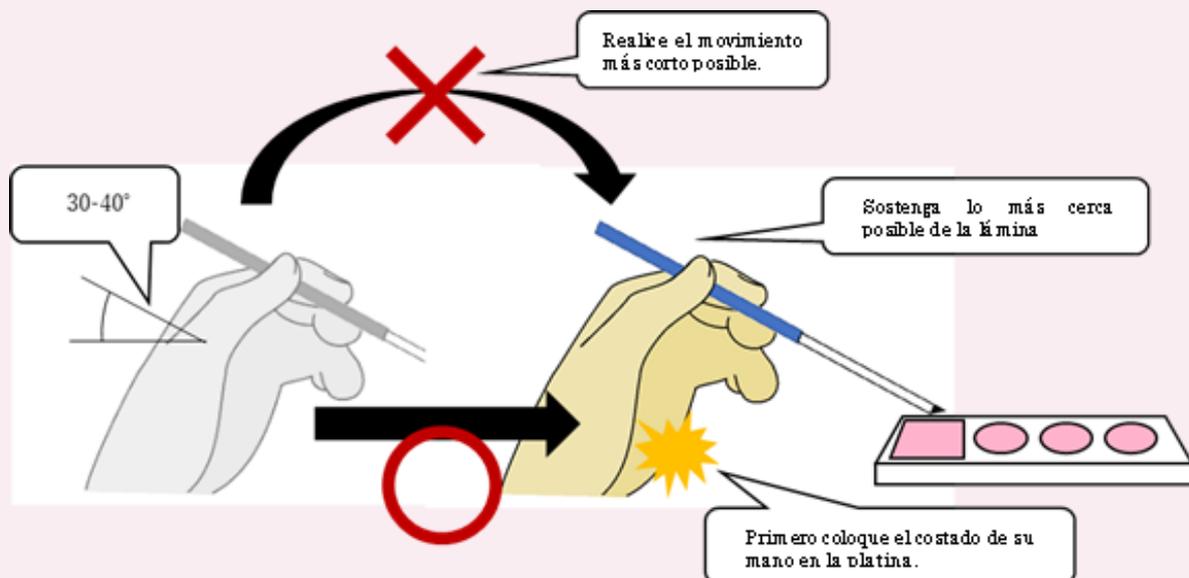
<p>3</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Introduzca inmediatamente el Cryotec desde el nitrógeno líquido hacia el TS (en 1 segundo) (①). 2. Inicie el temporizador y espere 1 minuto sin mover el Cryotec. 3. Asegúrese de que el ovocito/embrión se separe del Cryotec y flote durante el proceso de descongelación. <ul style="list-style-type: none"> * Si el ovocito/embrión flota y se aleja del Cryotec, es necesario tomarlo y colocarlo al fondo para evitar que llegue a la superficie. * Si el ovocito/embrión no se separa por sí mismo del Cryotec, mueva el Cryotec suavemente hacia los lados, o aspire cuidadosamente el ovocito/embrión directamente de la lámina.
---	--

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.

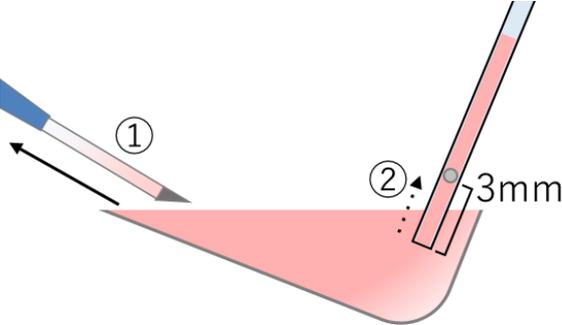
Consejos para sumergir el Cryotec en el pocillo de TS

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 del TS como guía. Esto 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.



[PASO 5]

Dilución en el DS (2 minutos)

	Figura	Procedimiento
1	 <p>TS</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Después de 1 minuto en TS, retire cuidadosamente el Cryotec (①). 2. Aspire el ovocito/embrión del TS, luego lentamente aspire 3 mm de TS en la pipeta (②).

VERIFICAR:

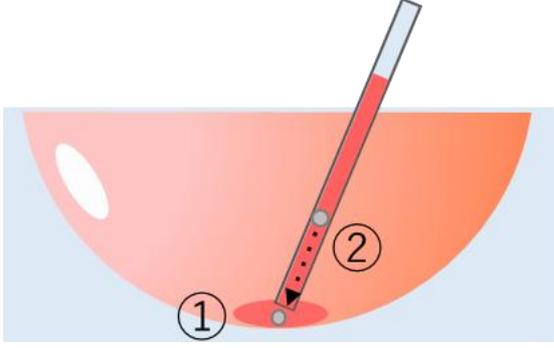
Si el ovocito/embrión todavía no se ha separado de la lámina después de un minuto, coloque la pipeta Pasteur debajo de ella y presione suavemente para separarla. Asegúrese de no tocar directamente el ovocito/embrión.

VERIFICAR: Si el ovocito/embrión desaparece

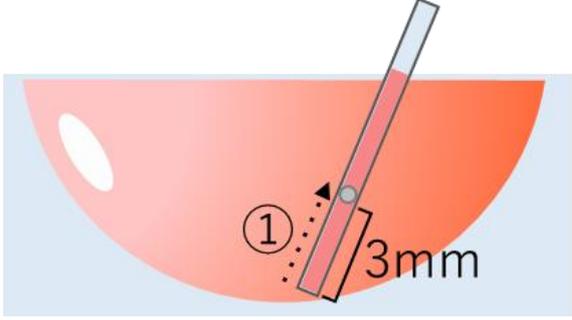
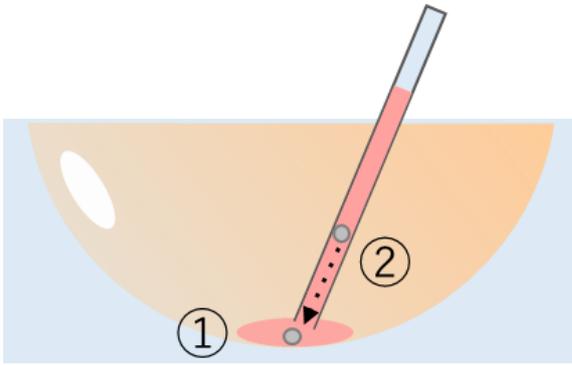
Si usted coloca con éxito el ovocito/embrión en la lámina de Cryotec durante el proceso de vitrificación, el ovocito/embrión ESTÁ dentro del pocillo de TS. Nuestra solución de TS tiene una toxicidad mínima, por lo que tendrá tiempo para buscar tranquilamente el ovocito/embrión.

VERIFICAR:

Puede medir 3 mm usando el indicador en la placa y en tapa de la Placa de Descongelación.

2	 <p>DS</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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). 2. Coloque el ovocito/embrión suavemente en la parte inferior de la capa de TS (②). 3. Apague la luz del microscopio y espere 2 minutos.
---	---	---

Dilución en el WS1 (3 minutos)

	Figura	Procedimiento
1	 <p>DS</p>	<p>1. Aspire el ovocito/embrión del DS, luego lentamente aspire 3 mm de DS en la pipeta (①).</p>
2	 <p>WS1</p>	<p>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).</p> <p>2. Coloque el ovocito/embrión suavemente en la parte inferior de la capa de DS (②).</p> <p>3. Utilice el máximo aumento para analizar y memorizar la forma detallada del ovocito/embrión. Apague la luz del microscopio y espere 3 minutos</p> <p>4. Después de 3 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.</p>

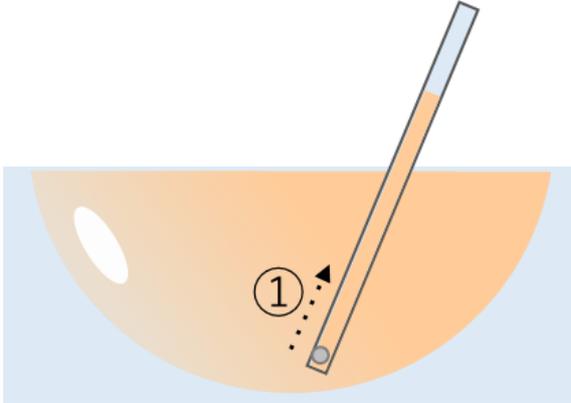
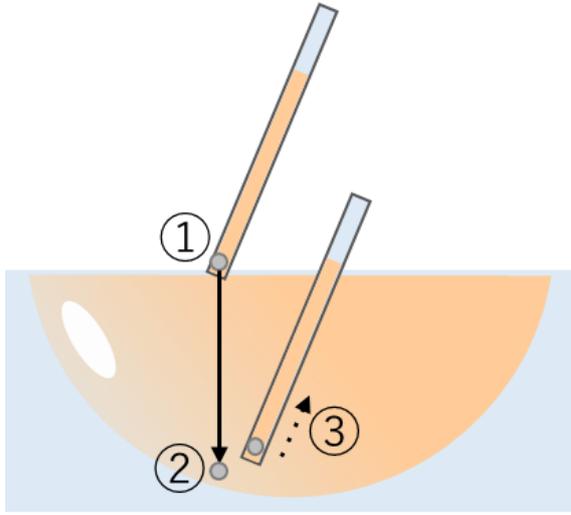
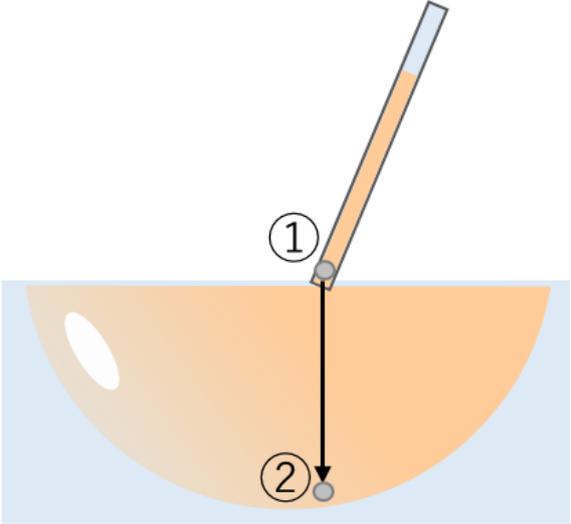
VERIFICAR:

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 la condensación: 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 niños si más del 30% de los blastómeros sobreviven:

- Para un embrión en etapa de 2 células, 1 blastómero
- Para un embrión en etapa de 4 células, 2 blastómeros
- Para un embrión en etapa de 8 células, 3 blastómeros

Lavado en el WS2 (1 minuto)

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

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.