	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-005	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 1 de 13

1. OBJETIVO

Describir los lineamientos adecuados para una correcta criopreservación de gametos y embriones, de tal forma que se garantice la viabilidad de estos posterior a su desvitrificación o descongelación dependiendo del caso.

2. ALCANCE

Este manual comprende todas las fases para la obtención de gametos y embriones y su posterior criopreservación en taques de nitrógeno procedimientos realizados por los embriólogos encargados de laboratorio de fecundación In Vitro de la clínica Fertility Care.

3. DEFINICIONES

CRIOPRESERVACIÓN: es el proceso en el cual las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo.


VITRIFICACIÓN: procedimiento de conservación de células que consiste en la eliminación de cristales de hielo en el interior de las células lo que permite una mayor viabilidad de éstas por un largo periodo de tiempo.

4. PROCEDIMIENTO

4.1 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

La criopreservación de muestras de semen es un procedimiento que permite almacenar los gametos masculinos por un largo periodo de tiempo sin que se le altere su capacidad fecundante, este procedimiento está indicado en:

- **Congelación de semen de donantes:** La congelación de semen donado tiene como objetivo viabilizar procedimientos de inseminación o reproducción asistida (FIV o ICSI), en parejas o pacientes en donde existe infertilidad por factor masculino (azoospermia, oligoastenoteratozoospermia severa), o en mujeres que deseen embarazarse y no tengan pareja.
- **Preservación de la fertilidad:** Este procedimiento está dado para pacientes que de forma preventiva deseen guardar su semen, por temor a perder la capacidad reproductiva por alguno de los siguientes motivos:
 - ✓ Paciente previo a vasectomía
 - ✓ Paciente previo a una cirugía que pueda comprometer su función reproductiva
 - ✓ Paciente previo a tratamiento oncológico
 - ✓ Paciente con alto grado de riesgo profesional

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 2 de 13

✓ Paciente expuesto a medio ambiente tóxico o carcinógeno

- **Depósito por tratamiento:** Servirá para aquellos pacientes que necesitan guardar muestras de semen, biopsia testicular o punción de epidídimo para ser usadas posteriormente en tratamientos de fertilidad en su pareja:
 - ✓ Pacientes que no pueden asistir el día del procedimiento para dejar la muestra para el tratamiento
 - ✓ Pacientes con disfunciones sexuales o problemas anatómicos que impiden una adecuada función reproductiva
 - ✓ Pacientes con azoospermia obstructiva y en cuyo caso se han practicado biopsia testicular como fuente de los gametos masculinos para el procedimiento de microinyección ICSI.


4.1.1 PROCEDIMIENTO PREVIO A LA CONGELACIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN

1. Las muestras de semen serán recolectadas por los pacientes siguiendo las recomendaciones dadas en el FERT-BR-INS-001- INSTRUCTIVO PARA LA TOMA DE MUESTRA Y ANALISIS SEMINAL.
2. Una vez tomada la muestra se deben registrar los datos del paciente en los formatos FERT-BR-F-068 ANALISIS DE MUESTRAS y el FERT-BR-F-061 CONTROL MUESTRA ESPERMOGRAMA.
3. La muestra es llevada al laboratorio y se procede a su análisis básico cómo se indica en el FERT-BR-M-001 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA.
4. El paciente debe tener el resultado de todas la pruebas infecciosas, negativas y vigentes (fecha de realización menor a 6 meses)
5. El paciente debe realizar un mínimo de 3 congelaciones con muestras tomadas con un intervalo de tiempo de más o menos 3 días.

4.1.2 CONGELACIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN

4.1.2.1 MATERIALES

- Crioprotector (SPERM – CRYOPROTEC™)
- Muestra se semen completa
- Tubos falcon fondo redondo de 14 ml
- Tubos falcon de 5 ml fondo redondo
- Pipetas Pasteur plásticas

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 3 de 13


- Pajillas para semen de 0.5 ml
- Crio-viales
- Etiquetas para pajillas y/o crio-viales
- Jeringa de insulina con punta de silicona acoplada para llenar pajillas
- Nitrógeno líquido
- Cronómetro
- Toallas de papel desechables
- Pinzas metálicas
- Escalerillas
- Globets
- Flotador para pajuelas
- Elementos de protección personal (guantes, gorro, tapabocas)

4.1.2.2 PROCEDIMIENTO

- Antes de proceder a congelar la muestra se debe tener todo el material dispuesto y a la mano.
- La proporción de crioprotector/ muestra es de 1: 3 es decir 1 parte de crioprotector por 3 partes de muestra (por ejemplo: 1ml de crioprotector por 3 ml de semen)
- Se toma el crioprotector (el cual debe permanecer siempre frío) y se va mezclando con el semen, gota a gota para evitar el choque osmótico. Este procedimiento debe realizarse en un laxo de tiempo inferior a 10 min.
- Las pajuelas se deben marcar previamente con:
NOMBRES Y APELLIDOS DEL PACIENTE O CÓDIGO DEL DONANTE
NÚMERO DE CÉDULA (SI ES PACIENTE)
FECHA DE CONGELACIÓN.
- Seguidamente con una pipeta de vidrio con chupa de silicona acoplada se procede a cargar las pajuelas (previamente marcadas) con 0,5ml de semen + crioprotector cuidando de que no queden espacios con aire, una vez llenas se sellan con calor. También se pueden cargar las pajuelas con la ayuda de una jeringa de insulina con punta de silicona acoplada (Imagen1)



Imagen 1. Jeringa de insulina para cargar pajuelas

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 4 de 13

- Una vez cargadas las pajuelas se dejan en vapores de nitrógeno líquido por 30 minutos, para esto se agrega nitrógeno en una cava de Icopor y se utiliza el flotador de pajuelas. (Figura 2)

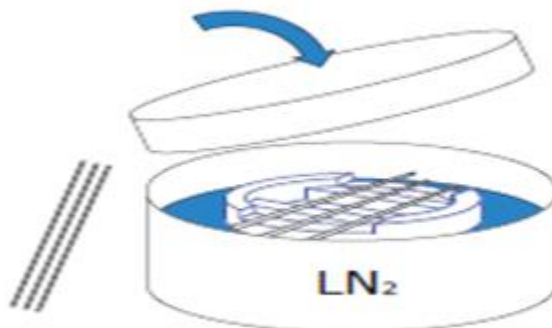



Figura 2. Pajuelas en vapores de nitrógeno líquido (30 min)

- Pasados los 30 minutos se depositan directamente las pajuelas en nitrógeno líquido y se procede a guardarlas en el globet y la escalerilla correspondiente en el banco de semen. Los globet también deben estar marcados con los datos del paciente y / o donante y fecha de congelación.
- Todos los datos de la congelación quedan registrados en el FERT-BR-F-070-INFORME CONGELACIÓN DE SEMEN en donde se relaciona: los datos del paciente y/o donante, análisis de la muestra inicial, datos de la congelación y la posición en banco.
- Se lleva un registro en Excel llamado BANCO DE SEMEN en donde se van registrando todas las congelaciones realizadas y se les va asignando una posición ascendente a los pacientes en los cánister de los termos de nitrógeno líquido en donde se almacenan las pajuelas.

4.2 CRIOPRESERVACIÓN SE ASPIRADO DE PEIDÍDIMO Y/O BIOPSIA TESTICULAR

4.2.1 MATERIALES

- Crioprotector (SPERM – CRYOPROTEC™)
- Muestra se aspirado de epidídimo o biopsia testicular
- Tubos falcon cónico de 15 ml
- Tubos falcon de 5 ml fondo redondo
- Pipetas Pasteur plásticas
- Crio-viales

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 5 de 13

- Etiquetas para crio-viales
- Nitrógeno líquido
- Placa de aluminio
- Cronómetro
- Toallas de papel desechables
- Pinzas metálicas
- Escalerillas
- Globets

4.2.2 PROCEDIMIENTO

- Antes de iniciar la congelación se deben tener todos los materiales listos para el procedimiento y los crioviales marcados con los nombres, apellidos, número de cédula del paciente y la fecha de la congelación.
- Las muestras previamente lavadas como se indica en el numeral **9.8.2.3** del FERT-BR-M-001 – MANUAL DE ANDROLOGÍA, se mezclan con el crioprotector en una proporción 3:1 (por cada 3 partes de muestra 1 parte de crioprotector).
- El crioprotector que debe permanecer frío se va mezclando con la muestra lavada, gota a gota para evitar el choque osmótico. Este procedimiento debe realizarse en un laxo de tiempo inferior a 10 min.
- Previamente se ha debido preparar la placa de aluminio sobre la cual se va a congelar la muestra en forma de perlas, esta placa se debe colocar sobre una cava con nitrógeno líquido de tal forma que el vapor del nitrógeno enfríe completamente la placa. (figura 3)

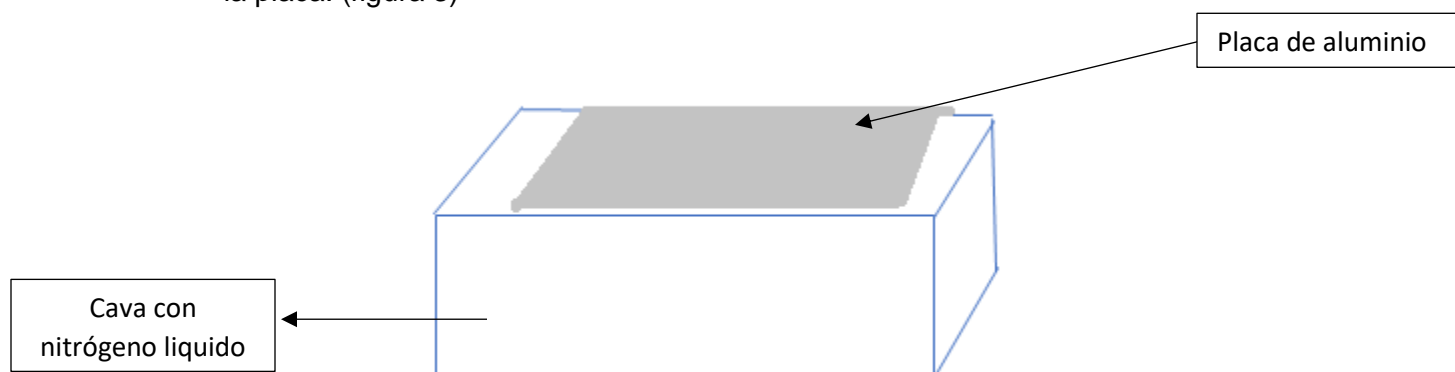



Figura 3.

la placa de aluminio para la congelación

- Una vez mezclada la muestra con el crioprotector procedemos a formar las perlas, tomando un volumen de muestra con una pipeta Pasteur plástica e ir colocando gota a gota la muestra sobre la placa de aluminio previamente enfriada, a medida que las gotas caen éstas se van congelando inmediatamente, formando así las perlas. (figura 4).

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 6 de 13

- Repetimos el procedimiento hasta que hayamos agotado todo el volumen de la muestra, luego con una pinza estéril procedemos a despegar las perlas de la platina y las depositamos dentro del criovial previamente marcado, el criovial lo debemos llenar con nitrógeno líquido antes de depositar las perlas en su interior.
- Debemos ir contando cuantas perlas depositamos en cada criovial para luego registrar la cantidad obtenida en el FERT-BR-F-070- INFORME CONGELACIÓN DE SEMEN.

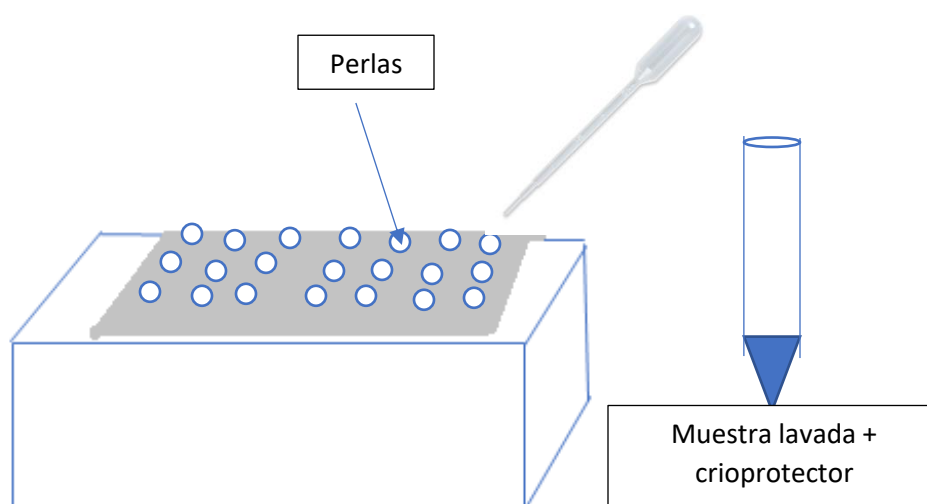



Figura 4.
pera

Formación de perlas
criopreservación de
muestra de aspirado de epidídimo y/o biopsia testicular

- Todos los datos de la congelación quedan registrados en el FERT-BR-F-070- INFORME CONGELACIÓN DE SEMEN en donde se relaciona: los datos del paciente y/o donante, análisis de la muestra inicial, datos de la congelación y la posición en banco.
- Se lleva un registro en Excel llamado BANCO DE SEMEN en donde se van registrando todas las congelaciones realizadas y se les va asignando una posición ascendente a los pacientes en los cánister de los termos de nitrógeno líquido en donde se almacenan las pajuelas.

4.3 DESCONGELACION PAJILLAS DE SEMEN CONGELADO

En los casos en que el semen provenga del criobanco, ya sea semen homólogo congelado (semen de la pareja) o heterólogo congelado (semen de donante), este se debe pasar por el proceso de descongelación antes de proceder a capacitarlo.

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 7 de 13


El proceso de descongelación de semen es el siguiente:

Si es semen homólogo congelado:

- Verificar en la carpeta de BANCO DE SEMEN, en el FERT-BR-F-062 ALMACENAJE Y DESTINO MUESTRAS DE SEMEN CONGELADO, los datos sobre la congelación de la muestra (fecha, cantidad de pajillas congeladas y ubicación en el banco) y en la historia clínica del paciente, revisar en el episodio de congelación de la muestra seleccionada sus condiciones precongelación y anotar está en el formato correspondiente de acuerdo al procedimiento destino.
- Sacar la pajuela del termo donde se encuentra almacenada y se deposita en un tubo falcon de 14 ml que contiene agua estéril a 37 °C hasta que no se observen cristales de hielo (2 a 3 min)
- Una vez el semen se haya descongelado transferir la pajuela a otro tubo falcon de 14 ml y cortar los extremos para que el semen descongelado salga.
- La muestra se deja estabilizar en la incubadora por 5 min y luego se procede a realizar el procedimiento de capacitación espermática recomendado el cual es gradientes de concentración, este lavado se realiza siguiendo las indicaciones del numeral **9.4.2** del FERT-BR-M-001 MANUAL DE ANDROLOGÍA.
- Anotar en el FERT-BR-F-062 ALMACENAJE Y DESTINO MUESTRAS DE SEMEN CONGELADO la fecha de descongelación, cantidad de pajillas descongeladas y el nombre y número de historia de la paciente al que fue destinada esta muestra, haciendo la respectiva descarga y anotar el total de pajillas en existencia que quedan.

Si es semen heterólogo congelado:

- Verificar en la carpeta de BANCO DE SEMEN, en el FERT-BR-F-062 ALMACENAJE Y DESTINO MUESTRAS DE SEMEN CONGELADO, los datos sobre la congelación de la muestra (fecha de congelación, cantidad de pajillas congeladas y/o recibidas y ubicación en el banco, condiciones precongelación) y anotar está en el formato correspondiente de acuerdo al procedimiento destino.
- Sacar la pajuela del termo donde se encuentra almacenada y se deposita en un tubo falcon de 14 ml que contiene agua estéril a 37 °C hasta que no se observen cristales de hielo (2 a 3 min)
- Una vez el semen se haya descongelado transferir la pajuela a otro tubo falcon de 14 ml y cortar los extremos para que el semen descongelado salga.
- La muestra se deja estabilizar en la incubadora por 5 min y luego se procede a realizar el procedimiento de capacitación espermática recomendado el cual es gradientes de concentración, este lavado se realiza siguiendo las indicaciones del numeral **9.4.2** del FERT-BR-M-001 MANUAL DE ANDROLOGÍA.
- Anotar en el FERT-BR-F-062 ALMACENAJE Y DESTINO MUESTRAS DE SEMEN CONGELADO la fecha de descongelación, cantidad de pajillas descongeladas y el

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 8 de 13

nombre y número de historia de la paciente al que fue destinada esta muestra, haciendo la respectiva descarga y anotar el total de pajillas en existencia que quedan.

5. VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

La vitrificación se refiere a la solidificación de un líquido no por cristalización sino por una elevación extrema de la viscosidad de la solución. Esto ocurre debido a la presencia de soluciones acuosas con una elevada concentración de crioprotectores, las cuales al ser congeladas pasan de un estado líquido a otro no estructurado conocido como amorfo (Fahy et al., 1984a; Kasai, 1994).

La vitrificación se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado amorfo de características similares a las del vidrio.

Durante la vitrificación, el rápido descenso de temperatura determina que la viscosidad de la muestra aumente hasta llegar a un punto en el cual las moléculas se inmovilizan; de esta forma obtenemos un estado sólido con la estructura molecular de un líquido extremadamente viscoso (Critser et al., 1997). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500 oC/min.) junto con elevadas concentraciones de crioprotectores (5 a 7 M) (Shaw et al., 2000; Vajta, 2000).


Mediante el uso de microvolúmenes ($< 1\mu\text{l}$) y altas concentraciones de agentes crioprotectores se pueden conseguir velocidades de congelación extremadamente rápidas (de 15000 a 30000 oC) (Vajta et al., 1998; Vieira et al., 2002; Chen et al., 2001; Mavrides & Morroll, 2002).

A diferencia de la congelación lenta, donde las soluciones se expanden durante la congelación como consecuencia del mayor volumen ocupado por el hielo (Mazur, 1990), las soluciones de vitrificación ocupan el mismo volumen o uno menor al ser enfriada (Rall & Hahy, 1985).

La desvitrificación ocurre debido a que el rango de temperatura en el cual la nucleación máxima (nucleación máxima de núcleos de hielo) tiene lugar es mucho menor que aquel en el cual los cristales de hielo se expanden. La temperatura máxima de nucleación está en el rango de los -80 a -120 oC, mientras que la temperatura a la cual los cristales de hielo se expanden se localiza entre los -40 y -80 oC (Fahy et al., 1990^a; Mc Farlane, 1986^a).

Cuando vitrificamos, la temperatura máxima de expansión del hielo es relevante, debido a que no existen núcleos de hielo presentes que puedan crecer. El principal problema en estas técnicas es la temperatura máxima de nucleación, la cual aumenta a medida que nos acercamos a la Tg "temperatura de transición del vidrio".

Los protocolos de vitrificación presentan numerosas ventajas y ciertas desventajas al ser comparados con las técnicas de criopreservación convencionales. Dentro de las principales

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 9 de 13

ventajas de las técnicas de vitrificación encontramos que, en estos protocolos, se obtienen sólidos amorfos (en estado vítreo) y no sólidos cristalinos (Rall & Fahy, 1985). Así mismo, esta técnica no requiere de equipos de congelación caros y/o sofisticados, ya que para su realización son suficientes el nitrógeno líquido y los vapores de nitrógeno (Vajta & Nagy, 2006).


Otra ventaja que presentan estas técnicas es que consiguen reducir el tiempo total requerido para la criopreservación; ya que en tan solo 10 minutos podemos conseguir la vitrificación de un gran número de ovocitos y embriones (Rall & Fahy, 1985; Kasai, 1994; 1996a y b; Otha et al., 1999)

5.1 MATERIALES

- Kit de vitrificación (Cryotech Vitrification Kit 101)
- Stripper y capilares de 175 o 290 µm
- Micropipeta de 20 a 200 µl
- Reproplate para vitrificación
- Pajuelas Cryotop
- Estereomicroscopio
- Estación de trabajo (cabina de flujo)
- Sticker para marcar pajuelas
- Marcadores punta delgada
- Globets
- Escalerillas
- Cava de Icopor
- Nitrógeno líquido
- Pinzas

5.2 PROCEDIMIENTO

- Antes de iniciar el procedimiento se deben apagar las platinas térmicas de la estación de trabajo y disponer todo el material necesario para la vitrificación.
- Marcar las pajuelas usando el Sticker, estas deben ir marcadas con: nombres y apellidos de la paciente, número de cédula, fecha de congelación y # de embriones u ovocitos que se congelaran en esa pajuela.
- Si se tratara de una donante la pajuela deberá ir marcada en vez de nombres y apellidos con el código de la donante, los demás datos son iguales que para pacientes.
- Las pajuelas se marcan en la parte superior, como forma de orientación adicional se puede hacer una marca con marcador de un color diferente al de la pajuela, que indique el lado donde quedaron los embriones u ovocitos, de tal forma que cuando se vayan a desvitrificar se coloque la pajuela en posición correcta evitando así la pérdida de los mismos. (Figura 5).
- El medio de Equilibrio (ES) y el medio de Vitrificación (VS) deben ser equilibrados a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES	Código PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia 11/03/2022	Versión 1	Página 10 de 13

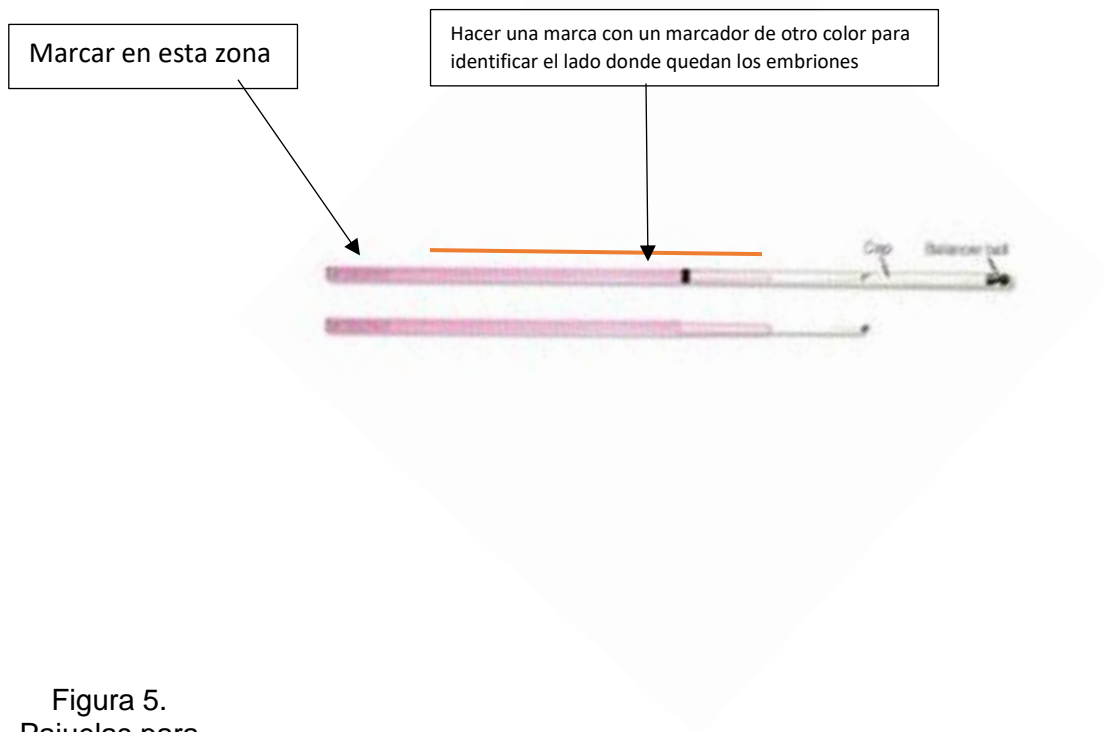


Figura 5.
Pajuelas para

vitrificación de ovocitos y embriones

- Equilibrio de ovocitos o embriones**

1. Preparar el plato de vitrificación con los medios así: en el primer pozo colocar 300 µl del medio ES, y en el segundo y tercer pozo 300 µl de medio VS. (figura 6)




	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código	
			PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 11 de 13

Figura 6. Plato para vitrificación

2. Coloque el ovocito / embrión en la superficie de ES que está en el primer pozo.

3. El ovocito / embrión se hundirá y comenzará a encogerse vuelve al tamaño original (máximo 15 minutos para ovocitos y blastocistos, y 12 min para otras etapas de embrión.

• Vitrificación

4. Transfiera el ovocito / embrión a la profundidad del segundo pozo con el medio VS. (con un volumen mínimo de ES en el primer paso) el ovocito / embrión flota inmediatamente a la superficie de VS.

5. Después de lavar la pared interior de la pipeta con medio VS fresco, tome solo el ovocito / embrión y transfíralo al fondo. Espere hasta que el ovocito / embrión deje de flotar en VS.

6. Transfiera el ovocito / embrión a la profundidad del tercer pozo con el medio VS, y mezcle los medios con una pipeta haciendo un suave movimiento sobre el ovocito o embrión.

7. Tome solo el ovocito / embrión en el extremo superior de la pipeta y póngalo en el extremo de la pajuela donde se congelará con un volumen mínimo de medio.

8. Sumergir inmediatamente la pajuela en nitrógeno líquido.

9. Coloque la tapa y guárdela en un tanque de nitrógeno. Este procedimiento si ilustra en la figura 7.

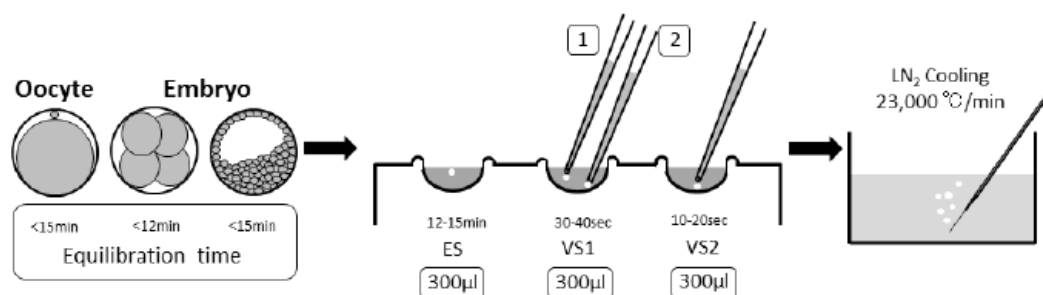



Figura 7. Procedimiento de vitrificación

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código PS-DC-004	
	Fecha de Vigencia	11/03/2022	Versión 1	Página 12 de 13

- Todos los datos de la vitrificación se deben registrar en el **SEGUMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI**
- Se deben registrar los datos de numero de pajuelas y embriones u ovocitos congelados en el **BANCO DE GAMETOS Y EMBRIONES** en el


6. DESVITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

6.1 MATERIALES

- Kit de desvitrificación (Cryotech Warming kit 102)
- Stripper y capilares de 175 o 290 µm
- Micropipeta de 20 a 200 µl
- Reproplate para desvitrificación
- Estereomicroscopio
- Estación de trabajo (cabina de flujo)
- Cava de Icopor
- Nitrógeno líquido
- Pinzas

6.2 PROCEDIMIENTO

- Antes de realizar la desvitrificación se debe corroborar los datos de la paciente a la cual se le va a realizar el procedimiento de transferencia de embriones descongelados o desvitrificación de ovocitos para microinyección, de igual forma si es una donante de óvulos se deberán verificar los datos de ésta y de su receptora.
- Se debe dejar registro del número de pajuelas descongeladas y del material descongelado (ovocitos o embriones) en el **BANCO DE GAMETOS Y EMBRIONES** y en el **SEGUMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI** correspondiente a la paciente o donante.
- Una vez que los embriones u ovocitos sean descongelados, la pajuela en donde permanecían se anexará a la hoja de **SEGUMIENTO EMBRIONARIO FIV/ICSI** como constancia de que se desvitrificó el material correcto.
- **Preparación**
- Todo el proceso debe realizarse a temperatura ambiente (25- 27°C).
- Coloque la placa de calentamiento y el vial de TS (con eliminación) en la incubadora a 37 ° C 3 horas antes del uso (es preferible el almacenamiento nocturno).

	MANUAL DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS Y EMBRIONES		Código PS-DC-004	
			Versión 1	Página 13 de 13
	Fecha de Vigencia	11/03/2022		

- Exponga los viales DS y WS a temperatura ambiente al menos 1 hora antes el uso
- Saque la placa tibia y el vial de TS de la incubadora y agregue el contenido del vial en el primer pozo cuadrado.
- Calentamiento y dilución de CPAs**
 - Rápidamente (en 1 segundo) coloque el Cryotec en el primer pozo cuadrado con TS, y espera 1 min.
 - Mientras espera, llene el segundo pozo con 300 µl de DS.
 - Aspirar el ovocito / embrión y 3 mm de largo de TS en la pipeta, y expulsarlos más lentamente al fondo del segundo pozo (DS) y espera 3 min.
 - Mientras espera, llene el tercer pozo con (WS1) y el cuarto (WS2) con 300 µl de WS cada uno.
 - Aspirar el ovocito / embrión y 3 mm de largo de DS en la pipeta, y expulsarlos lentamente al fondo del tercer pozo (WS1), y esperar 5 min.
 - Dé un juicio de supervivencia al final de este paso si el ovocito / embrión que está encogido se recupera o no.
 - Coloque el ovocito / embrión en la superficie del cuarto pozo (WS2). Cuando se hundan y lleguen al fondo, vuelva a colocarlos en la superficie del mismo WS2 para lavar 2 veces en total.
 - Coloque el ovocito / embrión en la gotita de los medios de cultivo para la recuperación para ICSI o TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. Este procedimiento se ilustra en la figura 8

Figura
8.
Proceso

