

Red Latinoamericana de Reproducción Asistida

**PRIMER TALLER DE
CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES**

Dictado por: Ellen Marelló, BS

Con la colaboración de:

Unidad de Fertilidad del Country - Bogotá - Colombia

FECUNDITAS - Buenos Aires - Argentina

FERTILITAT - Porto Alegre - Brasil

Documento preparado por:

Claudia Borrero, MD

Catalina Zuluaga, BS

Mónica Jiménez, BS

M. Soledad Sepúlveda, PhD

Diciembre de 1996

Como parte del programa de capacitación de la RED, durante 1996 se realizaron tres talleres teórico-prácticos de “Criopreservación de embriones”, dirigidos a biólogos y tecnólogos pertenecientes a centros de la RED. El primer taller se realizó en la Unidad de Fertilidad del Country en Bogotá los días 4 y 5 de Diciembre y contó con la participación de 8 alumnos pertenecientes a Colombia, México, Panamá y Venezuela. El segundo taller se realizó en el centro FECUNDITAS en Buenos Aires los días 7 y 8 de Diciembre y contó con la participación de 4 alumnos de Argentina.

El tercer taller se realizó en el centro FERTILITAT en Porto Alegre los días 10 y 11 de Diciembre y contó con la participación de 5 alumnos de Brasil.

Durante la realización de estos talleres, los alumnos adquirieron conocimientos teóricos de criobiología y experiencia práctica en la preparación de medios crioprotectores, en el uso de la máquina de congelación y en la puesta en marcha de un protocolo lento de criopreservación de embriones. El material biológico utilizado en los ensayos fue el embrión de ratón.

Luego de una positiva evaluación por parte de los alumnos participantes en los talleres, la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida está contribuyendo en la capacitación de profesionales que forman parte de los laboratorios de Reproducción Asistida en Latinoamérica.

Firma

Indice

Introducción

Criopreservación de Embriones

- Equipos, materiales y reactivos
- Preparación de las soluciones de criopreservación
- Clasificación de los *concepti* a criopreservar
- Protocolo de equilibrio con el crioprotector
- Programa de congelación lenta

Descongelación de Embriones

- Equipos, materiales y reactivos
- Preparación de las soluciones de descongelación
- Protocolo de descongelación

Documentación y registro

Almacenamiento de embriones criopreservados

Uso de la unidad de criopreservación Planer KRYO 10

Transferencia de embriones congelados

Materiales y Proveedores

Referencias

INTRODUCCION

En 1972, Whittingham y col. publicaron los primeros resultados de congelación y descongelación de embriones de ratón. Actualmente, el procedimiento se realiza con éxito en diferentes especies de mamíferos. Sin embargo, sólo en 1983 Trounson y Mohr reportaron el primer embarazo en humanos y en 1984 Zeilmarker y col. el primer nacimiento, luego de transferir embriones descongelados. Desde entonces miles de niños han nacido en el mundo mediante técnicas de reproducción asistida, en que se ha utilizado la criopreservación de embriones (*concepti*).

Durante el proceso de criopreservación los *concepti* son expuestos gradualmente al crioprotector, se enfrían a temperaturas bajo 0°C, se induce la formación de cristales de hielo en el medio externo (*seeding*) y finalmente se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C. Durante el proceso de descongelación, los *concepti* son expuestos a temperatura ambiente, se remueve el crioprotector y retornan al ambiente fisiológico.

Durante la congelación, los cristales de hielo se forman primero en el medio extracelular, creando un gradiente de potencial químico que favorece la salida de agua del interior de las células. Si no se logra una adecuada deshidratación se formarán cristales de hielo en el interior de la célula y ocurrirá recristalización durante la descongelación, con graves consecuencias para la integridad estructural de la célula.

El uso de crioprotectores es fundamental para la supervivencia del *conceptus* que se desea criopreservar. Se utilizan crioprotectores permeables como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el propanediol (PROH), y no permeables como la sacarosa. Los crioprotectores permeables disminuyen el punto de congelación intracelular y los no permeables favorecen la deshidratación por efecto osmótico.

Actualmente, los diversos grupos en el mundo criopreservan desde el estado de pronúcleos hasta blastocisto. Sin embargo, la sobrevida no es igual para todos los estados del desarrollo y varía

además, con el protocolo de congelación-descongelación empleado. Las tasas de supervivencia reportadas varían entre 50% y 90 %, con tasas de embarazo cercanas al 20%.

Este manual pretende ser una guía simple y práctica para la criopreservación de embriones. Se describe un protocolo de criopreservación lenta, utilizando PROH como crioprotector.

CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES

La criopreservación de *concepti* en división debe realizarse preferentemente en estados exponenciales de mitosis (2, 4, 8 células). Esto porque la respuesta de la célula al procedimiento de criopreservación varía durante el ciclo celular. En estados intermedios de clivaje algunas células se pueden encontrar en distintas etapas de división incluso con el huso mitótico ensamblado. Este es afectado por las bajas temperaturas, siendo por lo tanto, posible provocar daños a nivel cromosómico.

La solución de congelación utilizada en este protocolo contiene el crioprotector (PROH) preparado en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con 20 % de proteína y sacarosa.

El programa de congelación comienza con enfriamiento lento hasta llegar a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. En esta etapa se realiza el *seeding*, que tiene por objeto provocar la nucleación de cristales de hielo en el medio externo de la célula. Los cristales son incapaces de atravesar la membrana plasmática. El citoplasma adquiere un potencial químico superior a la solución externa. Así para restablecer el potencial, comienza a salir agua, que se va congelando externamente. Se produce así una deshidratación del *conceptus*, que hace improbable la formación de hielo intracelular.

El enfriamiento lento ($-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) continúa hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este punto se ha liberado la mayor parte del agua y el remanente se vitrifica con una caída rápida de la temperatura hasta $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, momento en el cual los *concepti* se almacenan a en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos:

- Incubadora de CO_2
- Microscopio estereoscópico
- Campana de flujo laminar
- Máquina de criopreservación
- Tanques para nitrógeno líquido
- Sellador de pajillas
- Balanza automática.

Materiales:

- Cápsulas NUNC de 4 pozos
- Cápsulas Petri (35 x 10 mm)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de 1, 5, 10 ml
- Frasco de 50 ml
- Filtros de 0.2 μm
- Jeringas de 10 ml
- Cinta para marcar
- Pinzas
- Escalerillas
- Goblets
- Reloj-cronómetro
- Pañuelos desechables

Reactivos:

- PBS estéril (Irvine Scientific)
- Sustituto de Suero Sintético (SSS) (Irvine Scientific)
- 1,2 propanediol (PROH) (Sigma)
- Sacarosa (Sigma, S1888)
- Nitrógeno líquido

Preparación de medios para la criopreservación

Solución N° 1 (solución madre):

Preparar 25 ml de PBS suplementando con 20 % de SSS, tomando 20 ml de PBS y 5 ml de SSS. Homogeneizar la mezcla.

Solución N° 2 (PROH 1.5 M):

Colocar 8.9 ml de la solución N° 1 en un tubo cónico de 15 ml y agregar 1.1 ml de PROH. Mezclar bien.

Solución N° 3 (PROH 1.5 M + sacarosa 0.1 M):

Colocar 8.9 ml de la solución N° 1 en un tubo cónico de 15 ml y agregar 1.1 ml de PROH. Pesar 0.342 gr de sacarosa, agregar y mezclar bien hasta que la sacarosa se disuelva completamente.

Filtrar las soluciones con miliporo de 0.2 μm antes de usar. Las soluciones tienen una duración de

48hrs guardadas a 4 °C.

Procedimiento:

Preparar los multipozos. Se puede usar 1 caja hasta para 6 embriones que vayan a ser criopreservados. Identificarla de la siguiente manera:

- Nombre de la paciente en la parte superior.
- Pozo N° 1 marcar con PBS (Solución N°1)
- Pozo N° 2, 3 y 4 marcar con el número correspondiente al embrión y a la solución N° 2.

Agregar 0.8ml de PBS al pozo N° 1 y 0.8ml de la solución N° 2 a los pozos N° 2, 3 y 4. Todas las soluciones deben ser usadas a temperatura ambiente.

Preparar 1 caja de Petri de 35mm por cada 4 ó 6 embriones a congelar. Marcarla con el nombre de la paciente y llenarla con 2.0ml de solución N° 3.

Marcar 1 pajilla para cada 2 embriones y purgarla con la solución N° 3.

Preparar banderillas de cinta para cada pajilla. Marcarlas con el nombre de la paciente, fecha, número de embriones congelados y números de la pajilla correspondiente.

Preparar la máquina de congelar. Llenar a un 70 - 90% el tanque con Nitrógeno líquido. Colocar la bomba dentro del tanque y asegurarse que este bien sellado. Prender la máquina y encender el botón de la plataforma para que la presión empiece a subir. Una vez alcanzada la presión adecuada (5.0 lbs), entrar al programa y esperar que alcance la temperatura inicial (16°C).

Figura 1: Modelo de pajilla

Clasificación embrionaria:

Todos los embriones que son potencialmente congelables deben ser examinados y clasificados de acuerdo a las siguientes 8 preguntas:

1. Es un embrión sincrónico en su clivaje? (2, 4 u 8 células)
2. Son sus blastómeras de forma regular?
3. Son sus blastómeras de tamaño regular?
4. Esta el embrión libre de fragmentos?
5. Esta el citoplasma claro y parejo? (no granuloso, ni oscuro)
6. Sus membranas son suaves, refringentes y definidas?
7. El embrión llena la zona? (no esta contraído)
8. Es apropiada la división celular para el tiempo? (4 células-48 horas) (8 células-72 horas)

Por cada **SI**, se recibe 0.5 punto. Embriones con 2 puntos ó más son congelables.

Protocolo de Congelación y Almacenamiento:

1. Colocar los embriones que clasificaron para ser congelados en el pozo que contiene Solución N°1 (PBS + 20 % SSS) a temperatura ambiente para lavar rápidamente.
2. Transferir los embriones a la Solución N°2 (1.5M PROH en PBS+20 % SSS) por 10 minutos. Empezar a medir el tiempo con el primer par de embriones transferidos y llevar el registro para cada embrión.
3. Transferir los embriones a la caja de petri de 35mm con la Solución N°3 (1.5M PROH + 0.1M Sacarosa). Todos los embriones deben hundirse hasta el fondo de la caja (aproximadamente 1 minuto). Cuando se congela en estado de pronúcleos se debe prolongar un poco este tiempo (aproximadamente 2 minutos) antes de montar las pajillas.
4. Conectar la pajilla con la jeringa de 1.0ml y purgar con la Solución N°3. Introducir la pajilla nuevamente en esta solución y succionar entre 1.0 a 1.5cm, hacer una burbuja de aire de más ó menos 0.3cm , succionar nuevamente solución y tomar los embriones (3.0cm), hacer burbuja de aire

de 0.3cm y nuevamente solución (1.0cm). Llevar la columna de fluido hasta el extremo con PVA y sellar la pajilla con calor. Marcar cada pajilla con su banderilla correspondiente y colocarlas en posición vertical dentro de la cámara de congelación.

5. Una vez estén todos los embriones colocados en la cámara, iniciar el programa presionando el botón **RUN** en el panel del computador.

6. El programa de congelación requiere hacer el *seeding* (cristalización) manual a -8.0 °C. Tomar unas pinzas metálicas enfriadas en nitrógeno líquido, elevar la pajilla por la banderilla (sin sacarla totalmente de la cámara) y con las pinzas hacer contacto directo sobre el borde de la primera burbuja de aire hasta que se vea la solución cristalizada, inmediatamente colocarla de nuevo en la cámara. Repetir este procedimiento en todas las pajillas y al finalizar, presionar **RUN** para que el programa continúe.

7. Mientras el programa esta corriendo, completar toda la información en los registros y marcar los goblets y escalerillas con nombre de la paciente, fecha y número de embriones congelados.

8. Al finalizar la congelación, enfriar los goblets fijados en las escalerillas dentro de un termo con Nitrógeno líquido. Remover rápidamente las pajillas de la cámara y guardarlas dentro de los goblets, llenar el espacio vacío con papel y transferir al tanque de almacenamiento, anotar el sitio de almacenamiento en el registro de la paciente.

9. Presionar **RUN** para que la máquina vuelva a su temperatura inicial y sacar la presión de Nitrógeno líquido de la cámara. Cuando este haya llegado a 0.0 lbs, sacar la bomba y tapar el tanque.

Programa para la máquina de congelación:

- Temperatura inicial 16.0 °C.

- Rampa 1: -2.0 °C por minuto hasta -8.0 °C.

- Rampa 2: $-8.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para equilibrar. Hacer el *seeding* manual y luego sostener la temperatura por 5 minutos más.

- Rampa 3: $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta $-30.0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Rampa 4: $-50.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta $-150.0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Duración del programa aproximadamente de 2 horas.

DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES

Las condiciones de descongelación son fundamentales para la supervivencia de los embriones criopreservados. Las pajuelas retiradas del tanque de Nitrógeno líquido deben ser mantenidas a temperatura ambiente durante 40 segundos antes de ser colocadas en baño de agua (30°C). El primer paso (mantener las pajuelas a temperatura ambiente) reduce la posibilidad de daño de la pajuela y el segundo minimiza el tiempo en el cual los cristales de hielo pudiesen crecer, lesionando las células.

El proceso de descongelación y retiro del crioprotector se logra bajando las diluciones de PROH gradualmente en presencia de sacarosa. La sacarosa mantiene el gradiente osmótico extracelular que previene la entrada de agua excesiva durante el retiro del crioprotector. Cuando el crioprotector ha salido completamente, el embrión se coloca en el medio de cultivo y el agua retorna dentro de la célula.

Equipos, Materiales y Reactivos:

Equipos:

- Incubadora de CO₂.
- Microscopio-estereoscópico.
- Cámara de flujo laminar.
- Balanza analítica.

Materiales:

- Cajas de Petri de 35x10mm.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 10ml, 5ml y 1ml
- Frasco de 50ml.
- Filtros de 0.2 µm.
- Jeringas de 10ml.
- Tubos cónicos graduados
- Jeringa de 1ml.
- Pinzas
- Reloj-cronómetro.
- Cajas multipozos.
- Pañuelos desechables.

Tijeras
Termómetro
Vaso precipitado

Reactivos:

PBS estéril (Irvine Scientific)
Suero Sintético Sustituto (Irvine Scientific)
1-2 Propanediol - PROH (Sigma, P 1009)
Sacarosa, (Sigma, S 1888)

Preparación de los medios de descongelación:

Solución N° 1:

Preparar solución madre al 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS). 20ml de PBS más 5.0ml de SSS. Homogeneizar la solución.

Solución N° 2:

Agregar 9.25ml de la Solución N°1 dentro de un tubo cónico y adicionar 0.75ml de PROH, mezclar muy bien. Esta solución es 1.0M PROH.

Solución N° 3:

Pesar 0.342gr de sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0ml de la Solución N°2. Mezclar muy bien hasta que la Sacarosa se disuelva completamente. Esta solución es 1.0M PROH + 0.2M Sacarosa.

Solución N°4:

Mezclar 5ml de la Solución N° 2 con 5.0 ml de la Solución N° 1. Esta solución es 0.5M PROH.

Solución N° 5:

Pesar 0.342gr de Sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0ml de la Solución N°4. Mezclar muy bien hasta que la sacarosa se disuelva completamente. Esta solución es 0.5M PROH + 0.2M sacarosa.

Solución N° 6:

Pesar 0.342gr de Sacarosa en un tubo cónico y agregar 5.0ml de la Solución N°1. Esta solución es 0.2M Sacarosa. Filtrar las soluciones antes de usar en tubos cónicos nuevos. Las soluciones pueden ser usadas hasta 48 horas después de preparadas si se almacenan a 4°C.

Procedimiento:

Preparar los multipozos- 1 caja por cada pajilla que se va a descongelar. Identifíquela de la siguiente manera:

- Nombre de la paciente en la parte superior.
- Pozo N°1 marcar con 1.0M PROH + 0.2M sacarosa (sol. #3)
- Pozo N°2 marcar con 0.5M PROH + 0.2M sacarosa.(sol. #5)
- Pozo N°3 marcar con 0.2M sacarosa.(sol. #6)
- Pozo N°4 marcar con PBS con 20% SSS (sol #1)

Agregar 0.8ml de cada solución en su correspondiente pozo. Todas las soluciones deben ser usadas a temperatura ambiente.

Preparar un tubo Falcon de 6.0ml por cada pajilla que se va descongelar. Marcar con el nombre de la paciente y número de la pajilla. Agregar 1.0ml de solución N°1.

Protocolo de descongelación:

1. Preparar en el vaso de precipitado el agua a 30°C.
2. Llenar un termo con Nitrógeno líquido y transferir el goblet que contiene los embriones que se van a descongelar (mantener siempre el nivel de Nitrógeno líquido por encima del *goblet*).
3. Remover la pajilla del Nitrógeno líquido y empezar a medir del tiempo. (sostener la pajilla con unas pinzas metálicas para evitar la transferencia de calor). Descongelar la pajilla a temperatura ambiente por 30 segundos. Limpiar la escarcha con un pañuelo desechable y confirmar la integridad

de la pajilla.

4. Sumergir la pajilla en el agua a 30°C por 40 a 50 segundos, sin agitar.
5. Remover y secar suavemente con un pañuelo desechable el exceso de agua. Cortar con las tijeras el extremo que fue sellado con calor, empatar con la jeringa de 1.0 ml y cortar el extremo que viene sellado de fabrica. Suavemente expulsar los embriones en el pozo N°1 (1.0 M PROH+0.2 M sacarosa) y dejarlos por 5.0 minutos. Si los embriones no se ven, lavar la pajilla suavemente varias veces con la solución hasta que los embriones se recuperen.
6. Transferir los embriones al pozo N°2 (0.5 M PROH+0.2 M sacarosa) por 5.0 minutos.
7. Transferir los embriones al pozo N°3 (0.2 M sacarosa) por 10 min.
8. Transferir los embriones al pozo N°4 (PBS + 20 % SSS) por 10 min.
9. Transferir los embriones al tubo Falcon de 6.0ml con PBS + 20 % SSS, cerrar la tapa herméticamente y guardar en la incubadora a 37°C por 10 minutos.

10. Transferir los embriones a medio de cultivo gasificado y permitir el equilibrio en la incubadora por 30 minutos como mínimo antes de la transferencia. Cuando se descongela en estado de 2PN se debe dejar en cultivo toda la noche para hacer la clasificación embrionaria antes de transferir.

11. Almacenar toda la información en el registro de la paciente.

DOCUMENTACIÓN Y REGISTRO

Los registros de cada paciente deben ser archivados con la información completa, tanto del procedimiento como del resultado final.

Los reportes se deben llevar individualmente para cada paciente y junto con estos debe existir en el laboratorio un cuaderno para congelación y descongelación de embriones, donde se debe registrar el procedimiento paso a paso, las temperaturas iniciales y finales del programa, la temperatura en que se realizó el seeding y cualquier tipo de variable que se haya presentado tanto en el procedimiento como en el programa de la máquina de congelar.

A continuación encontrarán algunos modelos para la documentación y registro de estos procedimientos.

PUNTAJE PARA LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA
(PRE-CONGELACION)

Nombre: _____ Fecha: _____

Conteste **SI** ó **NO** a cada pregunta. Por cada **SI** se recibe 0.5 puntos.

Puntaje máximo: 4 Puntaje mínimo: 0

Embriones con 2 ó más puntos pueden ser congelados.

EMBRIÓN N°	1	2	3	4	5	6	7
1. Es un embrión sincrónico? (2, 4 u 8 células)							
2. Son sus blastómeras de forma regular?							
3. Son sus blastómeras de tamaño regular?							
4. Esta el embrión libre de fragmentos?							
5. Esta el citoplasma claro y parejo (no granuloso,no oscuro)							
6. Sus membranas son suaves, refringentes y definidas?							
7. El embrión llena la zona? (no contraído)							
8. Es apropiada la división celular para el tiempo? a. 2 a 4 células para 48 hrs							
b. 6 a 8 células para 72 hrs							
TOTAL							

LABORATORIO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*
CONGELACIÓN DE EMBRIONES

Nombre _____ Congelación N° _____
 Fecha _____ N° de embriones _____
 Hora _____ Ciclo Natural _____
 Ciclo Estimulado _____

Método: 1.5M PROH + 0.1M sacarosa. PBS al 20%

N° de Pajilla	N° de Embrión	N° de células	Calidad

Tanque N° _____

Canister N° _____

N° de goblets _____

Observaciones :

Biólogo _____

LA PACIENTE ACEPTA Y AUTORIZA LA CONGELACION

Firma _____ C N° _____

LABORATORIO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*
DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES

Nombre _____ Descongelación N° _____
 Fecha _____ N° de embriones _____
 Hora _____ Ciclo natural _____
 Ciclo estimulado _____

Método: 1.0M PROH+0.2M Sacarosa, 0.5M PROH+0.2M Sacarosa, 0.2M Sacarosa+PBS al 20%SSS.

Fecha de congelación _____

Tiempo de congelación _____

Estado embrionario _____

N° de Pajilla	N° de Células	Final	Embriones transferidos

Embriones que quedan congelados _____

Biólogo _____

LA PACIENTE ACEPTA Y AUTORIZA LA DESCONGELACION

Firma _____ CC N° _____

ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS

Consideraciones

Algunos factores deben ser considerados cuando se va a iniciar un programa de criopreservación en un laboratorio de Fecundación *In Vitro*.

Para establecer nuevos protocolos, el laboratorio debe asegurarse que las pacientes estén ampliamente relacionadas con los detalles operacionales de los nuevos procedimientos. Los aspectos técnicos deben ser ampliamente discutidos con anterioridad para prevenir futuras confusiones que involucren el desarrollo final, tales como limitaciones en el tiempo de almacenamiento, tasa de sobrevivencia, calidad y número de embriones.

Toda la información del procedimiento de criopreservación debe ser reportada. En caso de variaciones en el protocolo, se documentara para que en el futuro el personal del laboratorio tenga información en el momento del proceso de descongelación ó cuando se haga análisis retrospectivos de los resultados. Tasas de sobrevivencia de los embriones y tasas de embarazo, deben ser estrictamente vigiladas para detectar problemas y solucionarlos rápidamente.

El laboratorio en conjunto con los médicos, deben establecer hojas de consentimiento donde quede registrado:

1. Aceptación de la pareja para realizar el proceso de criopreservación.
2. Firma y documento de identificación de los 2 miembros de la pareja.
3. Número de embriones congelados.
4. Calidad embrionaria.
5. Edad embrionaria.
6. Alternativas del destino de los embriones congelados en caso de no desear otro embarazo, divorcio ó muerte.
7. Compromiso de la pareja a mantener contacto con la Unidad de Fertilidad y de informar cambios de ciudad, dirección y teléfono.

USO DE LA UNIDAD DE CONGELACIÓN PLANER KRYO 10

Programación

1. Presione PROGRAM
2. Entre el código de acceso.
3. Escoja el módulo deseado exit, view, edit, create, delete, configuration.

a. Un nuevo programa CREATING

- Entre el código.
- Escoja el número del programa, presione ENTER
- Escoja el nombre del programa. Use el tablero y las flechas para seleccionar las letras y los símbolos. Presione ENTER
- Escoja la temperatura inicial. Entre la temperatura numérica y presione ENTER ó presione ENTER sin entrar número para que quede con la temperatura ambiente. Presione CLEAR para borrar errores, 1 carácter a la vez.
- Escoja la tasa usando el signo +/- . Presione ENTER.
- Escoja la temperatura de parada de la tasa usando el signo O cuando sea necesario. Presione ENTER.
- Repita los pasos 5 y 6, usando CLEAR para borrar errores. Para mantener la temperatura escoja la rata cero y presione ENTER. El computador le preguntara cuanto tiempo desea mantener (HOLD). Entre el tiempo HOLD en horas y minutos. Presione ENTER.
- Al finalizar el programa entre rata cero y tiempo HOLD cero.
- Seleccione para realizar *seeding* manual, automático ó no *seeding*. Para *seeding* manual presione 1, entre la temperatura a la cual se realizará, presione ENTER.
- Seleccione el tiempo que la máquina debe mantener la temperatura antes de sonar la alarma para hacer el *seeding*. (Soak time). Presione ENTER.
- Para retornar al menú principal presione 0.

b. Revisar el programa VIEWING

- Presione PROGRAM, presione 1.
- Use la flecha o la tecla N° para decidir que programa quiere ver. Presione ENTER.
- Use flechas para mirar el programa hacia adelante ó hacia atrás.
- Presione CLEAR para retornar al programa de menú (ó la tecla > y finaliza el programa).
- Para retornar al menú principal presione 0.

c. Editar un programa EDITING

- Presione PROGRAM, presione 2.
- Use las flechas o la tecla N° para escoger que programa editar, presione ENTER. Presione CLEAR para retornar al programa menú.
- Use las flechas para revisar los pasos que necesite cambiar.
- Presione CLEAR para borrar el paso que quiere cambiar ó todo lo anterior.
- Vuelva a escribir el programa en el paso que esta. Note que las ratas de la rampa y la temperatura final de la rampa son almacenadas como un par de datos, cuando se vuelva a deben entrar nuevamente como un par.
- Para retornar al menú principal, presione 0.

d. Borrar un programa DELETING

- Presione PROGRAM, presione 4.
- Seleccione el programa a borrar, presione ENTER. Presione CLEAR para retornar al programa menú.
- Presione CLEAR para borrar el programa seleccionado ó ENTER para retorna el menú sin borrar.
- Para retornar al menú principal presione 0.

Corriendo el programa

1. Seleccione el modulo de RUN/HOLD y presiónelo.

2. Escoja el programa deseado, presione ENTER. Programe en la presentación la temperatura inicial deseada ó presente temperatura ambiente como temperatura inicial en el programa. Para cambiar la temperatura inicial, presione CLEAR. Entre la nueva temperatura inicial, presione ENTER para ir a la nueva temperatura inicial (salte al paso 3).
3. Presione RUN para alcanzar la temperatura inicial.
4. La temperatura de la cámara será indicada. Use las flechas si quiere revisar el programa.
5. Cuando la temperatura inicial es alcanzada sonará una alarma y presione CLEAR para darle tiempo para montar las muestras. Presione RUN/HOLD para continuar el programa.
6. Para hacer el *seeding* manual, la alarma sonará al llegar a la temperatura, manteniéndose constante durante el *seeding*, presione RUN/HOLD para que el programa continúe.
7. Al finalizar el programa sonará una nueva alarma y se mantendrá la temperatura, presione CLEAR para silenciar la alarma, remueva las muestras y presione RUN para calentar la cámara.
8. Una vez la cámara este caliente, presione RUN y retorne al menú principal.
9. Apague la máquina.

Nota: Para abortar un programa, presione 5/RESET y presione ENTER. Puede hacer un programa nuevo mientras se esta corriendo uno sin afectarlo.

Existen varias series en la Kryo 10 y pueden variar de esta guía.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS

Preparación endometrial

Entre las variables que afectan las tasas de embarazo en los ciclos de transferencia luego de congelación embrionaria están: la calidad de los embriones a congelar, la técnica de congelación y descongelación, el tiempo de almacenamiento de los *concepti* y la preparación del endometrio para la transferencia.

La transferencia embrionaria se puede realizar en ciclos ovulatorios naturales o substituidos. La posibilidad de realizar uno u otro depende de las preferencias de cada grupo, ya que en términos generales, no ha habido diferencias reportadas en las tasas de embarazo con uno u otro sistema. Si se descongelan los embriones en un ciclo ovulatorio espontáneo, se debe determinar con precisión el día del pico de la hormona luteinizante (LH) o el día de la ruptura folicular. Es igualmente importante, establecer la presencia de secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo. Los embriones descongelados de 2-4 células se transfieren al útero el día de la desaparición del folículo por ecografía o 2 días después del pico de LH en sangre. La transferencia debe coincidir con un desarrollo endometrial adecuado al estadio celular de los *concepti* congelados. Cuando se utiliza la supresión hipofisiaria seguida de la administración de estrógeno y progesterona, la transferencia embrionaria sigue el modelo utilizado para la donación de ovocitos que ha demostrado ser eficaz en ciclos de descongelación de embriones.

La transferencia de embriones criopreservados puede realizarse directamente al útero o a la trompa, ya que se han reportado tasas de embarazo entre 40 y 70 % con transferencia tubárica. Esta técnica de transferencia estaría indicada en aquellas pacientes con fallas repetidas de gestación luego de transferencias uterinas y en casos de dificultades técnicas para introducir el cateter a la cavidad uterina.

MATERIALES Y PROVEEDORES

Reactivos

Se recomienda que todos sean nuevos.

- PBS. Irvine Scientific Cat N° 9235. Botellas de 500ml.
- Plasmanate ó Suero Sintético Sustituto. Irvine Scientific Cat N° 99193. Caja de 12 botellas de 12ml cada una.
- 1,2-Propanediol. Sigma Cat N° P-1009. Botellas de 500ml.
- Sacarosa. Sigma Cat N° S-1888. Botellas de 500gr.
- Medio de cultivo embrionario: HTF de Irvine Scientific ó Menezo de Fertility Technologies.
- Embriones de ratón congelados: Los vende Fertility Technologies en estado de 1 y 2 células.

Materiales

- Reloj-Cronómetro.
- Tijeras.
- Fórceps (Pinzas pequeñas - 4'' long) para el manejo de las pajillas. Sigma Cat N° F-4017.
- Fórceps (Pinzas grandes - 12'' long) para el manejo de los termos con nitrógeno líquido. Sigma Cat N° F-4642. Opcional.
- Termómetro de Mercurio.
- Vaso precipitado con capacidad de 500 a 1000ml para preparar el agua a 30 grados centígrados.
- Jeringas de 1cc, sin aguja. Tuberculin Syringe steril. Becton Dickinson and Company. Estas se compran en farmacia.
- Pajillas estériles. TS-Scientific Cat N° IMV ZA475. En presentación de 5 pajillas por paquete.
- Escalerillas. Nunc CryoStore-Cane. Aluminum. Irvine Scientific Cat N° 378441. Vienen en presentación de 50 por paquete.
- Goblets para almacenar las pajillas. TS-Scientific Cat N° TS-300. Vienen en paquete de 50.

- Cinta de enmascarar ó para marcar las pajillas
- Marcadores. Sigmaware Fine-Tip. Sigma Cat N° S-6519. Viene en presentación de 10 por paquete.
- Toallas de papel.
- Cajas Multipozos. Nunclon-MultiDishes. Irvine Scientific Cat N° 176740. Viene en presentación de 120 paquetes de 4 cajas cada uno.
- Frascos estériles de 50 ml. Nunclon. Irvine Scientific Cat N°163371. Viene en paquetes de 20 cada uno.
- Tubos Cónicos estériles. Marca Nunc ó Falcon.
- Tubos Falcon de 6.0ml. Cat N° 2003.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de 10 ml, 5 ml y 1ml estériles.
- Cajas de Petri de 35 x 10mm.
- Filtros de 0.2 μm .
- Jeringas de 10ml.

Casas distribuidoras

1. Fertility Technologies. Fax: 508-6518233. Persona encargada Vicki Johnson.
2. Irvine Scientific. Fax: 714-2616522. Persona encargada Martha Ortega.
3. Sigma: Fax: 314-7715757
4. TS-Scientific. Fax: 215-2576046. Persona encargada Marian Graber.

REFERENCIAS

1. Whittingham DG, Leibo SP and Manzur P: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and 296°C . *Science* 1972; 187:411-414
2. Trounson A and Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305:707-709
3. Zeilmaker GH, Alborda AT, Van Gient Y, Rijkmans CMPM and Drogendjik AC: Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984; 42: 293-296
4. Lasalle B, Testart J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil. Steril.* 1985; 44: 645-651
5. Cohen J, Simons FR, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocyst: *J IVF Embr Transf* 1985; 2:59-74
6. Testart J, Lasalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986;46: 268-272
7. Testart J, Lasalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, Rainhorn JD, Frydman R: Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987; 48: 107-112
8. Takeda T: Effect of thawing procedures on damage to zonae pellucidae of bovine ova frozen in plastic straws. *Theriogenology* 1987; 27: 284
9. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C,

- Debache C, esquier L: Cryopreservation of human embryo and oocytes. *Hum Reprod* 1988 ; 3: 117-119
10. Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, Turner TG: Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988;49: 283-289
 11. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743-764
 12. Cohen J: Embryo freezing. *Third Annual In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: A comprehensive Update-1990*. Santa Barbara, California Jul 19-Aug 1, 1990
 13. Gonen Y, Balakier H, Powell W, Casper F. Use of gonadotropin releasing hormones agonists to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:918-922
 14. Schieve M: The science and significance of embryo cryopreservation. *J Zoo Wild Med* 1991; 22: 6-22
 15. Sathanandan M, Macnamee MC, Rainsbury P, Wick K, Brinsden P, Edwards RG: Replacement of frozen-thawed embryo in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study. *Hum Reprod* 1991; 6:685-7
 16. Balakier H, MacLusky N, Casper R: Characterization of the first cell cycle in human zygotes: Implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993 59: 359-65
 17. Veeck L, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ: Significantly enhanced pregnancy rate per cycle through cryopreservation and thaw of

- pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-1207
18. Alam V, Weckstein L, Ord T, Stone S, Balmaceda JP and Asch RH: Cumulative pregnancy rate from one gamete intra-Fallopian transfer (GIFT) cycle with cryopreservation of embryos: a practical mathematical calculation. *Hum Reprod* 1993; 44:559-562
 19. Gook D, Osborn SM, Johnston WI: Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 Propanediol and the configuration of the meitotic spindle. *Hum Reprod* 1993 8: 1101-1109
 20. Frederick JL, ord T, Stone S, Balmaceda JP, and Asch RH: Frozen zygote intrafallopian transfer: a successful approach for transfer of cryopreserved embryos. *Fertil Steril* 1994; 61:504-507
 21. Queenan JT, Veek L, Seltman HJ and Muasher SJ: Transfer of cryopreserved-thawed pre-embryos in a natural cycle or a programmed cycle with exogenous hormonal replacement yields similar pregnancy results. *Fertil Steril* 1994; 62:545-550
 22. Shaw JM, Ward C and Trounson AO: Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum Reprod* 1995 10: 396-402