

---

## PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN PARA MUESTRAS CRIOPRESERVADAS DE REPROBANK.

---

La calidad de descongelación de las muestras enviadas ha sido testada previamente para cada una de ellas, por lo que ésta sólo puede ser garantizada si se siguen estrictamente las recomendaciones que se dejan a continuación. Cualquier modificación, tanto en la manipulación de las muestras, como en los medios utilizados, puede afectar la calidad del recuperado final. REPROBANK no se responsabiliza por modificaciones en este protocolo de trabajo.

### RECOMENDACIONES

1. Calcular el número de pajuelas necesarias para el procedimiento (En general 1-2 para FIV/ICSI, 3-4 para IUI). En caso de formatos “sábana”, la cantidad de pajuelas a utilizar queda a criterio de cada instituto, siguiendo las recomendaciones enviadas. En caso de muestras seleccionadas y enviadas para una receptora en particular, el instituto deberá utilizar la totalidad de las pajuelas enviadas.
2. Retirar las pajuelas del contenedor de nitrógeno adsorbido.
3. Depositarlas sobre un papel absorbente sobre platina térmica o a temperatura ambiente cercana a los 37°C durante 10 minutos.
4. Mientras transcurre ese tiempo, calentar los medios a 37°C y armar los gradientes de la siguiente forma:
  - a. Se utilizan 2 gradientes por pajueta. Dependiendo del número de pajuelas a utilizar, se prepararán los gradientes necesarios.
  - b. El gradiente se arma con una fase inferior de 0,6 ml de 90% y una fase superior de 0,6 ml de 50% de SpermGrad<sup>TM</sup> con TH3 (mHTF suplementado con HSA 3%).
5. Una vez que se terminan de armar los gradientes, secar bien las pajuelas por afuera y colocarlas todas juntas en un tubo tipo falcon de 15 ml. Cortar primero la parte inferior de la pajueta, colocarla dentro del tubo y luego cortar por debajo del filtro, cuidar que todo el contenido de la pajueta se vuelque dentro.
6. Por cada pajueta, agregar gota a gota 200 µl de TH3. Homogeneizar lentamente.

---

## PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN PARA MUESTRAS CRIOPRESERVADAS DE REPROBANK.

---

7. Tomar 300 µl de la mezcla y cargar cada gradiente.
8. Una vez cargados todos los gradientes, centrifugarlos a 1500 rpm durante 15 minutos.
9. Recuperar todos los pellets (tomando aproximadamente 400µl de cada uno) y juntarlos en un nuevo tubo tipo Falcon de 15ml.
10. Diluir ese volumen final con TH3 (lavado 1:1) y volver a centrifugar a 1700 rpm durante 7 minutos.
11. Resuspender en el volumen a inseminar y contar concentración y movilidad final.

**NOTA 1:** Los pellet de los gradientes no suelen ser muy consistentes, por esta razón es que se saca el pellet sin volcar el gradiente, sino yendo con el tip hasta el fondo del tubo y tomando los 400 µL.

**NOTA 2:** Se realizaron pruebas de descongelación con otros gradientes de densidad como Percoll<sup>TM</sup> o Isolate<sup>TM</sup>. Si bien es plausible usarlo, obtuvimos mucho menor rendimiento, por lo que desaconsejamos su uso.

### **MEDIOS UTILIZADOS:**

- mHTF: Modified HTF Medium with Gentamicin – HEPES. Irvine Scientific, ID: 90126. - HSA. Human Serum Albumin Solution. Irvine Scientific, ref: 9988.

Llamamos TH3 al mHTF suplementado con HSA 3%.

- SpermGrad®. Bicarbonate and HEPES buffered medium containing silane-coated, colloid silica particles. Vitrolife, Ref: 10099.

Fase superior: 50% de TH3 y 50% de SpermGrad Fase inferior: 10% de TH3 y 90% de SpermGrad

Cualquier duda por favor contactar a [laboratorio@repro-tec.com](mailto:laboratorio@repro-tec.com) , 011 4773-4889/5437 interno 103.  
Nuestro laboratorio recibe profesionales para capacitación individual en caso de ser necesario.