



FertiVit Congelamento

INSTRUÇÕES DE USO

NOME: FertiVit Congelamento

NOME TÉCNICO: MEIO DE CULTURA PARA FERTILIZACAO IN VITRO

MARCA: FERTIPRO

CLASSIFICAÇÃO NORMATIVA:Resolução RDC 185/2001

Regra: 13

Classe: Classe IV

DESCRIÇÃO DO PRODUTO:**PRODUTO ESTÉRIL**

FVC_KIT - FertiVit Congelamento:

CÓDIGO	CÓDIGO COMPONENTE	NOME DO PRODUTO	QT
FVC_KIT	FPI005	FertiVit Pré-incubação (PI)	1x5mL
	FVC1001	FertiVit Congelamento 1 (C1)	1x1mL
	FVC2001	FertiVit Congelamento 2 (C2)	1x1mL
	FVC3001	FertiVit Congelamento 3 (C3)	1x1mL
	FVC4001	FertiVit Congelamento 4 (C4)	1x1mL
	FVC5001	FertiVit Congelamento 5 (C5)	1x1mL

O kit FertiVit Congelamento consiste em um conjunto de meios para vitrificação de oócitos humanos e embriões humanos (de zigoto à blastocisto).

COMPOSIÇÃO

Meios são baseados na HTF e contém sacarose, albumina sérica humana (12-20 g/litro). Meio de congelamento também contém DMSO, Etileno Glicol (EG) e Ficoll.

Nome	Código	Função
Água ultra pura	(CAS No) 7732-18-5 (EC no) 231-791-2	Solvente
Albumina Sérica Humana- 25% (Albumina Sérica Humana, Caprilato de Sódio, N-Acetil-DL-Triptofano e Água pra Injeção)	(CAS No) 70024-90-7	Propriedade protetora I
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid)	(CAS No) 7365-45-9 (EC no) 230-907-9	Tampão
Lactato de sódio	(CAS No) 867-56-1 (EC no) 212-762-3	Propriedade protetora II
D-(+)-Glicose	(CAS No) 50-99-7 (EC no) 200-075-1	Substratos energéticos
Hidrogenocarbonato de Sódio	(CAS No) 144-55-8 (EC no) 205-633-8	Sais Básicos
Piruvato de sódio	(CAS No) 113-24-6 (EC no) 204-024-4	Substratos energéticos
Cloreto de sódio	(CAS No) 7647-14-5 (EC no) 231-598-3	Sais Básicos
Cloreto de potássio	(CAS No) 7447-40-7 (EC no) 231-211-8	Sais Básicos
Cloreto de cálcio di-hidratado	(CAS No) 10035-04-8	Sais Básicos
Dihidrogenofosfato de potássio	(CAS No) 7778-77-0 (EC no) 231-913-4	Sais Básicos
Sulfato de magnésio hepta- hidratado	(CAS No) 10034-99-8	Sais Básicos
Dimetilssulfóxido (DMSO)	(CAS No) 67-68-5	Catalisador
Etileno glicol (EG)	(CAS No) 107-21-1 (EC no) 203-473-3	Viscosidade I
Sacarose	(CAS No) 57-50-1 (EC no) 200-334-9	Agente hiperosmótico
Ficoll	(CAS No) 26873-85-8	Viscosidade II

FUNÇÃO	DESCRIÇÃO
Solvente	Para dissolver todas as matérias-primas em pó.
Sais Básicos	O papel dos sais equilibrados diluídos em água purificada é proporcionar um ambiente iônico que promove o metabolismo celular e equilíbrio osmótico extracelular.
Tampão	<p>Quando se manipulam células fora da incubadora, o bicarbonato não é um tampão adequado uma vez que o pH do meio aumentará para níveis não fisiológicos. Por conseguinte, quando se manipulam células fora da incubadora no ar ambiente, são utilizados outros tampões com níveis de pKa apropriados, por exemplo HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).</p> <p>HEPES estabiliza o pH sob ar (Clark e Swain 2014), portanto, a incubação de CO₂ não é necessária.</p>
Propriedade protetora I	<p>É amplamente aceito que a presença de albumina nos meios de preparação de esperma proporciona propriedades protetoras que ajudam a manter a viabilidade e motilidade do esperma.</p> <p>Também, as proteínas em meios tipicamente servem como agentes estabilizadores de membrana e transportadores (bem como uma fonte) de moléculas essenciais (Malda, et al., 2008). Além disso, a albumina de soro humano (HSA) facilita a manipulação de gametas ou embriões impedindo a adsorção à superfície através da saturação dos locais de ligação potenciais. Além disso, tem sido formulada a hipótese de que as proteínas poderiam ajudar a desintoxicar meios de comunicação através da ligação de contaminantes (Blake, Svalander, Jin, Silversand, & Hamberger, 2004).</p>
Propriedade protetora II	Monóxido de glicose e piruvato de sódio são substratos metabólicos essenciais. O lactato é também frequentemente adicionado ao meio de cultura como xarope de lactato de sódio. Sabe-se que os espermatozoides geram energia principalmente através de frutólise

	<p>(glicólise uma vez removida do plasma seminal), acumulando ácido láctico como subproduto metabólico. Portanto, adicionar lactato ao esperma pode parecer desnecessário. Contudo, a admissão de ar numa população de espermatozoides anaeróbios glicolizantes diminui a taxa de utilização de açúcar e o ácido láctico sofre oxidação como substrato para a respiração exógena. Como os espermatozoides humanos são expostos a uma atmosfera de ar ambiente durante o manuseio, processamento e análise, geralmente é adicionado algum lactato em meios de esperma (Mortimer e Mortimer, 2014).</p>
<p>Substratos energéticos</p>	<p>Existem duas formas principais pelas quais os mamíferos podem gerar ATP: pela oxidação de substratos energéticos em CO₂ e H₂O e pela conversão da glicose em ácido láctico por glicólise.</p> <p>Os oócitos têm um consumo baixo de oxigênio (Magnusson, Hillensjö, Hamberger, & Nilsson, 1986). Eles dependem de baixos níveis de oxidação do piruvato. O último é metabolizado diretamente para produzir ATP e conseqüentemente pode refletir a viabilidade do oócitos. De fato, demonstrou-se que os oócitos com níveis reduzidos de trifosfato de adenosina (ATP) têm um reduzido potencial de desenvolvimento (Van Blerkom, Davis, & Lee, 1995).</p> <p>Em embriões humanos, o piruvato suporta o desenvolvimento da fertilização e revelou-se essencial para o desenvolvimento pre-implantação precoce de embriões humanos (Conaghan, Handyside, Winston, & Leese, 1993). O lactato é adicionado aos meios de cultura de embriões para a maioria das espécies de mamíferos. Ele regula o metabolismo do piruvato e mantém potenciais redox (NAD⁺ / NADH) (Bavister, 1995). Embora a captação de glicose esteja presente em níveis muito baixos, acredita-se geralmente que a glicose não é necessária para a sobrevivência de embriões humanos pré-implantação precoce (Bavister, 1995). Contudo, a incorporação de glicose aumenta dramaticamente na transição entre a mórula e o estágio de blastocisto (Wales, Whittingham, Hardy & Craft, 1987) e torna-se a fonte de energia preferida.</p>

	<p>A energia para a motilidade do espermatozóide e as características de movimento necessárias para a fertilização são produzidas pelas mitocôndrias na parte central do espermatozóide (Mitchell, Nelson, & Hafez, 1976). A glicose é necessária para manter uma concentração ótima de ATP no espermatozóide humano através da glicólise e para suportar a motilidade ótima, mesmo quando o espermatozóide é fornecido com lactato e piruvato adequados para suportar a respiração mitocondrial (Williams & Ford, 2001). De fato, a adição de glicose 5 mM resultou em valores mais elevados de VAP de espermatozóides quando comparados com meio contendo glicose a 2,8 mM. Além disso, a glicose aumenta a hiperatividade do espermatozóide do tipo “whiplash”, o que aumenta a fertilização (Mahedevan, Miller, & Moutos, 1997).</p>
<p>Agente hiperosmótico</p>	<p>Desde 1988, Freedman et al. introduziu sacarose para melhorar a criorecuperação de zigotos pronucleares humanos (Freedman, Farber, Farmer et al., 1988). A adição de agentes não permeantes, como a sacarose, resulta em uma solução extracelular hiperosmótica, promovendo a desidratação celular e a diminuição da formação de cristais de gelo.</p>
<p>Viscosidade I</p>	<p>Os compostos tais como EG demonstraram penetrar rapidamente nas células, formando vidro durante o arrefecimento de soluções aquosas (Palasz & Mapletoft, 1996). De fato, EG e água formam grupos de ligações de hidrogênio de tal forma que as moléculas de água estão fortemente ligadas ao crioprotetor, resultando em uma menor mobilidade e maior viscosidade da solução. Isso contribui positivamente para a prevenção da formação de cristais de gelo e, portanto, EG tornou-se um componente importante das soluções de vitrificação (Courbière, Baudot, Mazoyer, Salle e Lornage, 2009).</p>
<p>Catalisador</p>	<p>EG foi relatado como um formador de vidro fraco (Fahy, Levy, & Ali, 1987). Uma vez que a vitrificação depende de uma solução suficientemente concentrada que se solidifique como vidro, o DMSO foi adicionado ao meio. Além disso, o DMSO é conhecido por</p>

	aumentar a permeabilidade de EG (Vicente & Garcia-Ximenez, 1994). Por estas razões, a maioria dos estudos descreve a combinação de EG e DMSO como crioprotetores comuns.
Viscosidade II	Sabe-se que a adição de macromoléculas promove a vitrificação aumentando a viscosidade da solução (Fahy, MacFarlane, Angell e Meryman, 1984). Menos CPAs são necessários para obter o mesmo grau de viscosidade, necessário para suportar o processo de vitrificação. Portanto, as propriedades de vitrificação da solução são mantidas mesmo quando as concentrações de CPA são reduzidas (artigo 134). Além disso, o aumento da viscosidade do meio, causada pela adição de HSA, promove a facilidade de manipulação de embriões (Trounson & Gardner, 2000).

ANTECEDENTES

Vitrificação de zigócitos e embriões é uma técnica estabelecida, a qual se tornou técnica padrão no contexto de reprodução assistida. Já que regulações Europeias definidoras dos requisitos de segurança médica para criopreservação de células humanas; frascos hermeticamente fechados (assépticos) foram desenvolvidos para evitar contato direto entre o embrião e o nitrogênio líquido durante o congelamento e armazenamento de longa duração. O kit FertiVit Congelamento foi projetado para trabalhar bem com as taxas reduzidas de congelamento que são inerentes ao uso de dispositivos de vitrificação fechados (devido a isolamento térmico). Nos anos recentes, houve também ressurgimento de interesse na criopreservação de oócitos devido ao desejo de preservar o potencial de fertilidade em mulheres jovens passando por tratamentos gonadotóxicos e legislação rigorosa que impede a criopreservação em alguns países. A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) relata resultado de uma metanálise a fim de avaliar a eficácia e segurança da criopreservação de oócitos. 1200 artigos foram avaliados, incluindo 4 ensaios clínicos controlados randomizados nos quais os desfechos com criopreservados e oócitos frescos em ciclos de FIV/ICSI foram comparados. Desses estudos, foi concluído que há boas evidências de que os desfechos clínicos são similares para procedimentos de reprodução assistida com oócitos frescos comparados a oócitos vitrificados/aquecidos.

Esses achados foram confirmados por dados clínicos obtidos com o kit FertiVit Congelamento.

ESTERILIZAÇÃO:

FertiVit Congelamento é esterilizado por técnicas de processamento asséptico (filtração estéril). O FertiVit Congelamento é uma solução sensível ao calor para o qual uma esterilização terminal resultaria em um nível de segurança de esterilidade (SAL) 10^{-6} não alcançado. A integridade dos componentes do meio só pode ser assegurada com o uso de técnicas de processamento assépticas (filtração) levando a um SAL de $< 10^{-3}$.

ESPECIFICAÇÕES DO PRODUTO

- pH: 7,20 – 7,50 (critério de liberação: 7,20-7,40)
- Osmolalidade (mOsm/kg):
 - Pré-incubação (PI): 270-295 (critério de liberação: 270-290)
- Esterilidade: estéril (SAL 10^{-3})
- Endotoxinas: $< 0,25$ EU/ml
- Ensaio de embriões de ratos (blastocistos após 96h): $\geq 80\%$

FORMAS DE APRESENTAÇÃO:

EMBALAGEM PRIMÁRIA:

COD. COMP.	QT.	DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO	DIMENSÃO Altura x Diâmetro
FPI005	5mL	Fracos de vidro tipo 1 hermeticamente fechados, com lacre revestidos de teflon (em concordância com as exigências da Farmacopéia Européia) e tampas de alumínio.	46.8 x 23mm
FVC1001	1mL		38,75 x 16,25mm
FVC2001	1mL		38,75 x 16,25mm
FVC3001	1mL		38,75 x 16,25mm
FVC4001	1mL		38,75 x 16,25mm
FVC5001	1mL		38,75 x 16,25mm

EMBALAGEM SECUNDÁRIA:

COD.	CÓD. COMPONENTE	QT	DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO	DIMENSÃO Altura x Largura x Comprimento
FVC_KIT	FPI005	1	Todos os componentes embalados em caixa de papel cartolina branca (Tambrite) - Acompanha com as instruções de uso.	90 x 55 x 52 mm
	FVC1001	1		
	FVC2001	1		
	FVC3001	1		
	FVC4001	1		
	FVC5001	1		

EMBALAGEM DE TRANSPORTE:

QT.	DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO	DIMENSÃO Altura x Largura x Comprimento	IMAGEM
*	São embalados em caixas de isopor (Resina de Poliestireno Grau GP31). - Existem 3 tamanhos conforme pedido.	12.5x14.5x23cm	
		22.5x31x16cm	
		40x33x29cm	
*	A caixa de isopor é embalada em caixa de papelão. - Existem 3 tamanhos conforme pedido.	34x41x32cm	
		15x24.5x16cm	
		22.5x31x15.5cm	

* Depende da quantidade solicitada.

DESEMPENHO PREVISTO NOS REQUISITOS GERAIS DA REGULAMENTAÇÃO DA ANVISA QUE DISPÕE SOBRE OS REQUISITOS ESSENCIAIS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE PRODUTOS MÉDICOS, BEM COMO QUAISQUER EVENTUAIS EFEITOS SECUNDÁRIOS INDESEJÁVEIS:

INDICAÇÃO

O Kit FertiVit Congelamento consiste em um conjunto de meios para vitrificação de oócitos humanos e embriões humanos (de zigoto à blastocisto).

INSTRUÇÕES DE USO DO PRODUTO:
MATERIAL NÃO INCLUSO:

- Placas de Poços
- Tanque de congelamento com nitrogênio líquido
- Banho-maria (capaz de manter 37°C)
- Pipetas atenuadas
- Fórceps

- Dispositivo de vitrificação fechado (ex. palheta HSV (Cryo Bio Systems) ou VitriSafe)
- Fluxo laminar (ISO Classe 5), Microscópio, temporizador de laboratório

FERTIVIT DE CONGELAMENTO E CULTURA EMBRIONÁRIA

- O kit FertiVit Congelamento pode ser usado em combinação com o GAIN, Meio FIV FertiCult e Meio de Lavagem FertiCult (FertiPro) para cultura, lavar oócitos e embriões antes da vitrificação e após aquecimento.

VERIFICAÇÕES PRÉ-USO

- Não use o produto se o mesmo se tornar turvo, ou demonstrar qualquer evidência de contaminação bacteriana.
- Não use o produto se o lacre do frasco estiver aberto ou danificado quando o produto for entregue.

MÉTODOS

- Se assegurar de que todos os frascos de meio do kit estão bem misturados antes do uso e aquecidos a temperatura ambiente (~22°C). É fortemente recomendado que se leia todas as etapas do procedimento de vitrificação antes de começar o procedimento.

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS com dispositivo fechado

Etapas preliminares

- Processo de resfriamento: Em uma placa de 6 poços, encher o primeiro poço com 250-300 µl de meio de pré-incubação, o segundo com Congelamento 1, terceiro com Congelamento 2 e assim sucessivamente até Congelamento 5.
- Abrir o número necessário de dispositivos de vitrificação, levando em conta que 1 dispositivo pode armazenar 2-3 oócitos, em um volume máximo de 1µl (checar as instruções para o dispositivo utilizado). Colocar as partes separadas do dispositivo na bancada para ter fácil acesso a eles no decorrer do procedimento.

- Podem ser realizados com um meio até 5 ciclos de vitrificação (do mesmo paciente). Não usar o mesmo meio para pacientes diferentes!

Protocolo de Cogelamento

- Aquecer todo o kit de meios a temperatura ambiente (22°C) antes do uso.
- Oócitos são expostos sequencialmente aos seguintes meios:

	PI	C1	C2	C3	C4	C5
DMSO/EG (%)	0	1.25	2.5	5	10	20
	2 min.	3 min.	3 min.	3 min.	5-6 min.	60 sec.*

* Nota: O processo completo de colocação do oócito no " Congelamento 5", segurando o oócito no dispositivo de vitrificação no máximo de 1µl C5, inserir o dispositivo em uma palheta secundária não deve levar mais de 60 segundos antes de submergir o dispositivo em nitrogênio líquido.

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES (ZIGOTO A BLASTOCISTO) com dispositivo fechado

Etapas preliminares

- Para vitrificação de embriões os seguintes meios **NÃO** são necessários:
 - FertiVit Congelamento 1
 - FertiVit Congelamento 2
- Procedimento de Congelamento: em uma placa de 6 poços, encher o primeiro poço com 250-300µl de meio de pré-incubação, o segundo com Congelamento 3, o terceiro com Congelamento 4 e o último com Congelamento 5.
- Abrir o número necessário de dispositivos de vitrificação, levando em conta que 1 dispositivo pode comportar 1-2 embriões em um volume máximo de carga de 1µl (checar as instruções do dispositivo que estiver usando). Colocar as partes separadas do dispositivo na bancada para ter fácil acesso a eles no decorrer do procedimento.
- Até 5 ciclos de vitrificação podem ser feitos com um meio (para o mesmo paciente). Não usar o mesmo meio para pacientes diferentes!

Protocolo de Congelamento

- Aquecer todo o meio do kit a temperatura ambiente (22°C) antes do uso.
- Embriões são expostos sequencialmente aos seguintes meios:

	PI	C3	C4	C5
DMSO/EG (%)	0	5	10	20
Zigotos	2 min.	5 min.	5 min. 30 seg.	40-60 seg.*
4células para blastocisto	2 min.	5 min.	4 min.	40-60 seg.*

* Nota: O processo completo de colocação do embrião no “Congelamento 5” segurando o embrião no dispositivo de vitrificação no máximo de 1µl C5, inserir o dispositivo em uma palheta secundária não deve levar mais de 60 segundos antes de submergir o dispositivo em nitrogênio líquido.

ADVERTÊNCIAS, PRECAUÇÕES, CUIDADOS ESPECIAIS E ESCLARECIMENTO SOBRE O USO DO PRODUTO BEM COMO SEU ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE:

ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO

- Armazenar entre 2-8°C.
- Não congelar antes do uso.
- Manter afastado de luz (solar).
- Os produtos podem ser usados com segurança até 7 dias depois de abertos, quando mantidas condições estéreis e os produtos armazenados a 2-8°C.
- Não usar após data de expiração.

TRANSPORTE:

- Não congelar.
- Pior das hipóteses: Estável após o transporte (máx.5 dias) a temperatura elevada ($\leq 37^{\circ}\text{C}$)

AVISOS E PRECAUÇÕES E PROCEDIMENTO DE DESCARTE:

Medidas padrão para prevenir infecções resultando do uso de produtos médicos preparado de sangue ou plasma humano incluem seleção de doadores, rastreio de doações individuais e testes plasmáticos para marcadores específicos de infecções e a inclusão de passos de fabricação efetivos visando inativação / remoção de vírus. Apesar

disso, quando produtos médicos administrados são preparados a partir de sangue ou plasma humano, a possibilidade de transmissão de agentes infecciosos não pode ser totalmente excluída. Isso também se aplica a vírus e patógenos desconhecidos ou emergentes. Não há trabalhos que provem transmissões virais com albumina fabricada para as especificações da Farmacopéia Européia por processos padrão.

Logo, manuseie todos os espécimes como potenciais transmissores de HIV ou hepatites.

Sempre use vestuário protetor quando manuseando espécimes. Sempre trabalhe sob condições de higiene estritas (ex fluxo laminar ISO Classe 5) para evitar possíveis contaminações.

Apenas para a utilização prevista. A segurança a longo prazo da vitrificação embrionária nas crianças nascidas por meio desse procedimento ainda é desconhecida.

IMPORTADOR:

INTERMEDICAL EQUIPAMENTOS UROLÓGICOS LTDA

RUA PAISSANDU 288 – LARANJEIRAS

RIO DE JANEIRO-RJ

CEP: 22210-080

01.856.395/0001-91

FABRICANTE LEGAL:

FERTIPRO N.V.

INDUSTRIEPARK NOORD 32

8730 BEERNEM, BELGICA

REGISTRO ANVISA N.º: XXXXXXXXXX**RESPONSÁVEL TÉCNICO:** Ronaldo Reis Fontoura - CRM 5251022-5**PRAZO DE VALIDADE:** 12 meses após data de fabricação.

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Ronaldo Reis Fontoura

CRM 5251022-5

REPRESENTANTE LEGAL

Ronaldo Reis Fontoura