



## HIALURONIDASE EM MEIO DE LAVAGEM FERTICULT™ INSTRUÇÕES DE USO

**NOME:** HIALURONIDASE EM MEIO DE LAVAGEM FERTICULT™

**NOME TÉCNICO:** MEIO DE CULTURA PARA FERTILIZACAO IN VITRO

**MARCA:** FERTIPRO

**CLASSIFICAÇÃO NORMATIVA:**Resolução RDC 185/2001

Regra: 17

Classe: Classe IV

**ABREVIações USADAS**

ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
FIV	Fertilização in vitro

**DESCRIÇÃO DO PRODUTO:****PRODUTO ESTÉRIL**

CÓDIGO	NOME DO PRODUTO	QT
HYA001	Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult	5x 1mL
HYA010	Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult	1x 10mL

**COMPOSIÇÃO**

Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult contém 80 IU/ ml de hialuronidase de origem bovina, em meio de Lavagem FertiCult (meio de tampão-HEPES, o qual contém 4.00g/litro de albumina do soro humano).

Nome	Identificador do produto	Função
Hialuronidase	(CAS No) 37326-33-3 (EC no) 253-464-3	Agente ativo
Água Ultrapura	(CAS No) 7732-18-5 (EC no) 231-791-2	Solvente
Cloreto de sódio	(CAS No) 7647-14-5 (EC no) 231-598-3	Sais Básicos
HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico)	(CAS No) 7365-45-9 (EC no) 230-907-9	Tampão
Albuma sérica humana	(CAS No) 70024-90-7	Propriedade protetora I

Lactato de sódio	(CAS No) 867-56-1 (EC no) 212-762-3	Propriedade protetora II
Glicose mono-hidratada	(CAS No) 14431-43-7	Substratos energéticos
Carbonato de hidrogênio de sódio	(CAS No) 144-55-8 (EC no) 205-633-8	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
Di-hidrogenofosfato di-hidratado de sódio	(CAS No) 13472-35-0	Sais Básicos
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	(CAS No) 10034-99-8	Sais Básicos
Piruvato de sódio	(CAS No) 113-24-6 (EC no) 204-024-4	Substratos energéticos

<b>FUNÇÃO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
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	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 (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico). HEPES estabiliza o pH sob ar (Clark e Swain 2014), portanto, a incubação de CO <sub>2</sub> não é necessária.
Propriedade protetora I	É amplamente aceito que a presença de albumina nos meios de preparação de esperma proporciona propriedades protetoras que

	<p>ajudam a manter a viabilidade e motilidade do espermatozoide.</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, &amp; Hamberger, 2004).</p>
<b>Propriedade protetora II</b>	<p>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 (glicólise uma vez removida do plasma seminal), acumulando ácido láctico como subproduto metabólico. Portanto, adicionar lactato ao espermatozoide 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 espermatozoide (Mortimer e Mortimer, 2014).</p>
<b>Substratos energéticos</b>	<p>Existem duas formas principais pelas quais os mamíferos podem gerar ATP: pela oxidação de substratos energéticos em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e pela conversão da glicose em ácido láctico por glicólise.</p> <p>Os oócitos têm um consumo baixo de oxigênio (Magnusson, Hillensjö, Hamberger, &amp; 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 oócito. De fato, demonstrou-se que os oócitos com níveis reduzidos de trifosfato de adenosina (ATP) têm um reduzido potencial de</p>

	<p>desenvolvimento (Van Blerkom, Davis, &amp; Lee, 1995).</p> <p>Em embriões humanos, o piruvato suporta o desenvolvimento da fertilização e revelou-se essencial para o desenvolvimento pré-implantação precoce de embriões humanos (Conaghan, Handyside, Winston, &amp; 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 &amp; Craft, 1987) e torna-se a fonte de energia preferida.</p> <p>A energia para a motilidade do esperma e as características de movimento necessárias para a fertilização são produzidas pelas mitocôndrias na parte central do espermatozóide (Mitchell, Nelson, &amp; Hafez, 1976). A glicose é necessária para manter uma concentração ótima de ATP no esperma humano através da glicólise e para suportar a motilidade ótima, mesmo quando o esperma é fornecido com lactato e piruvato adequados para suportar a respiração mitocondrial (Williams &amp; Ford, 2001). De fato, a adição de glicose 5 mM resultou em valores mais elevados de VAP de espermatozoides 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, &amp; Moutos, 1997).</p>
<b>Agente ativo</b>	<p>O esperma se aproxima do óvulo com a ajuda de vários mecanismos, incluindo a quimiotaxia. Em seguida, passa pelo processo de ativação e hiperativação de espermatozoides, e finalmente se liga às regiões externas do oócito. Para o esperma entrar no óvulo, deve passar pelas células da granulosa (corona radiata) antes de atingir a</p>

cobertura espessa da zona pelúcida. Nos seres humanos, o acrosoma contém enzimas digestivas como a hialuronidase. Por liberação de hialuronidase durante a reação do acrosoma, a facilidade de penetração das células espermáticas através do complexo cumulus-oophorus é facilitada pela abertura de caminhos entre as células da granulosa. A hialuronidase despolimeriza os polímeros de ácido hialurônico presentes no cimento intracelular que mantêm juntas as células da granulosa do óvulo. A reação acrosoma real só é iniciada à medida que o espermatozoide se aproxima da zona pelúcida do óvulo. A superfície anterior da cabeça de espermatozoide precisa ser removida permitindo a liberação de enzimas antes que o espermatozoide possa penetrar na zona pelúcida. Isso ocorre quando a membrana que circunda o acrosoma se funde com a membrana plasmática do espermatozoide expondo os conteúdos do acrosoma. O espermatozoide é então incorporado diretamente no citoplasma do oócito (Basu, 2011).

O uso de hialuronidase para facilitar o processo de desnudamento mecânico durante ICSI é um procedimento padrão nos procedimentos ART atuais. A desnudação dos oócitos é um pré-requisito essencial para ICSI, uma vez que a presença das células cumulus tornará muito difícil visualizar a maturação dos oócitos e bloqueará a agulha de injeção. As condições ópticas ótimas dos oócitos também são necessárias para determinar o posicionamento correto dos oócitos para injeção (Granot et al, 2001, u1-37)

Importante, o uso de um procedimento enzimático com hialuronidase para facilitar a desnudação mecânica de oócitos utilizados durante a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) é recomendado pelas diretrizes ESHRE (Sociedade Europeia para Reprodução e embriologia Humana) "Diretrizes revisadas para boas práticas em laboratórios de FIV" Por (Magli MC, 2008). Essas diretrizes foram publicadas em 2008 e serão atualizadas até o final de 2015.

**ESTERILIZAÇÃO:**

Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult é esterilizado por técnicas de processamento asséptico (filtração estéril).

Os meios de cultura celular descritos nesse documento são soluções sensíveis ao calor, para os quais 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: 7,30 – 7,60
- Osmolalidade: 270 – 290 mOsm/kg
- Esterilidade: estéril (SAL  $10^{-3}$ )
- Endotoxinas:  $< 1,00$  EU/mL
- Teste de embriões de camundongo:  $\geq 80\%$  blastocistos após 96 horas de cultura (exposição no estágio de zigoto).
- Uso dos produtos de graduação da Farmacopéia Européia ou USP, se aplicável.
- Um certificado de análise e MSDS estão disponíveis sob demanda.

**FORMAS DE APRESENTAÇÃO:**
**EMBALAGEM PRIMÁRIA:**

<b>COD.</b>	<b>QT.</b>	<b>DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO</b>	<b>DIMENSÃO</b> Altura x Diâmetro	<b>IMAGEM</b>
HYA001	1mL	Frascos de vidro tipo 1 hermeticamente fechados, com lacre revestidos de teflon (em concordância com as exigências da Farmacopéia Européia) e tampas de alumínio.	38,75 x 16,25mm (3mL)	
HYA010	10mL		55,3 x 28,4mm	

**EMBALAGEM SECUNDÁRIA:**

<b>COD.</b>	<b>QT</b>	<b>DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO</b>	<b>DIMENSÃO</b> Altura x Largura x Comprimento	<b>IMAGEM</b>
HYA001	5	Embalados em caixa plástica de poliestireno. - Acompanha com as instruções de uso.	90 x 66 x 20mm	
HYA010	1	Embalado unitariamente em caixa de papel cartolina branca (Tambrite). - Acompanha com as instruções de uso.	29x29x59 mm	

**EMBALAGEM DE TRANSPORTE:**

<b>COD.</b>	<b>QT.</b>	<b>DESCRIÇÃO E COMPOSIÇÃO</b>	<b>DIMENSÃO</b> Altura x Largura x Comprimento	<b>IMAGEM</b>
HYA001	*	São embalados em caixas de isopor (Resina de Poliestireno Grau GP31). - Existem 3 tamanhos conforme pedido.	12.5x14.5x23cm	
			22.5x31x16cm	
			40x33x29cm	
HYA010	*	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

Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult é usado no processo de desnudação do oócito. Hialuronidase digere o ácido hialurônico entre as células foliculares, que facilita a retirada mecânica do folículo.

### **DESCRIÇÃO DO PRINCÍPIO FÍSICO E FUNDAMENTOS DA TECNOLOGIA APLICADOS PARA O SEU FUNCIONAMENTO E SUA AÇÃO:**

Antes da fertilização, o oócito é cercado pela corona radiata e células foliculares dispersas. O ácido hialurônico na matriz intracelular faz com que o fluido que circunda essas células fique pegajoso e fibroso. Enzimas *In vivo*, como a hialuronidase são liberadas pela reação acrossômica das células espermáticas e dissolvem a matriz intercelular entre as células foliculares. Dessa maneira, o aglomerado de células foliculares é liberado e mais e mais células espermáticas são capazes de se ligar à zona pelúcida e sofrer a reação acrossômica subsequente.

A Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) recomenda o uso de um procedimento enzimático com hialuronidase seguido de desnudação mecânica com o uso de pipeta, para remoção das células foliculares e da corona radiata.

Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult foi designado para este propósito e contém 80IU/ml de hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult. Esse meio é tipicamente usado no processo de desnudação do oócito para digestão do ácido hialurônico entre as células foliculares.

O contato físico direto acontece entre os produtos do meio e o oócito humano. O meio não entra em contato com o corpo humano.

Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult é usado em laboratórios especializados em técnicas de fertilização, incluindo FIV e ICSI. Os usuários pretendidos são profissionais de FIV (técnicos de laboratório, embriologistas ou médicos).

**INSTRUÇÕES DE USO DO PRODUTO:****MATERIAL NÃO INCLUSO:**

- Incubadora (sem CO<sub>2</sub>)
- Placas de Petri
- Pipeta indicada para a desnudação do oócito
- Microscópio
- Óleo Mineral FertiCult
- Meio de Lavagem FertiCult

**VERIFICAÇÕES PRÉ-USO**

- Não use o produto se o mesmo estiver turvo ou mostrar qualquer sinal de contaminação bacteriana.
- Não use o produto se o lacre do frasco estiver aberto ou defeituoso quando o produto for entregue.

**INSTRUÇÕES DE USO**

1. Esquentar Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult a temperatura de 37°C.
2. Prepare uma placa contendo uma gotícula de Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult (100 µL) e 3-5 gotículas (100µL) de meio de Lavagem FertiCult para lavagem do oócito (tudo sob fina camada de óleo de parafina, ex. Óleo mineral FertiCult).
3. Colocar oócitos em Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult (até 5 oócitos no máximo) por aproximadamente 30 segundos.
4. Usando uma pipeta fina de vidro, transferir o oócito parcialmente desnudo na primeira gotícula de lavagem.
5. Remover a corona radiata pipetando os oócitos.
6. Usar as outras gotículas para lavagem posterior dos oócitos desnudos.

NOTA: Não incubar em uma incubadora de CO<sub>2</sub>. Hialuronidase em meio de Lavagem FertiCult meio de tampão-HEPES. Incubação em incubadora de CO<sub>2</sub> irá reduzir o pH abaixo de 7.

**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 longe da luz solar.
- Os produtos podem ser usados com segurança até 7 dias depois de abertos, quando condições estéreis são mantidas e os produtos são armazenados entre 2-8°C.
- Não usar após data de expiração.

**TRANSPORTE:**

- Transporte refrigerado (2-8°C).
- Não congelar.
- Pior das hipóteses: estabilizar após o transporte (máx.5 dias) a temperatura elevada ( $\leq 37^{\circ}\text{C}$ ).

**AVISOS E PRECAUÇÕES E PROCEDIMENTO DE DESCARTE:**

Medidas padronizadas para prevenir infecções resultantes do uso de produtos médicos preparados a partir de sangue ou plasma humano incluem a seleção de doadores, triagem de doações individuais e agregados de plasma para marcadores específicos de infecção e a inclusão de passos de fabricação efetivos para inativação/remoção de vírus. Apesar disso, quando produtos médicos preparados a partir de sangue ou plasma humano são administrados, a possibilidade de transmissão de agentes infecciosos não pode ser totalmente excluída. Isso também se aplica para vírus desconhecidos ou emergentes e outros patógenos. Não há trabalhos que comprovem transmissão viral com albumina fabricada sob especificações de processos estabelecidos da Farmacopéia.

Lidar com todos os espécimes como capazes de transmitir HIV e hepatites. Sempre usar vestimenta protetora quando lidar com espécimes.

O meio acima não contém antibióticos, sempre trabalhar sob condições restritas de higiene (ex. fluxo laminar ISO Classe 5) para evitar contaminação.

### **HALURONIDASE PROVENIENTE DE BOVINOS**

O grau farmacêutico de hialuronidase usado nesse produto é derivado de testículo bovino e é certificado com uma avaliação de risco TSE e Certificado de Adequação (CEP).

Os animais dos quais a hialuronidase é proveniente, são determinados “adequados para o consumo humano” e originários de países com “risco BSE desprezível”, como determinado pela Resolução No. 20 “Reconhecimento de Status de Risco de Encefalopatia Espongiforme Bovina em Países Membros (2015)”, adotada pela OIE. De acordo com os guidelines da Organização Mundial de Saúde em Distribuição Infecciosa dos Tecidos na Transmissibilidade das Encefalopatias Espongiformes (2010), testículos de origem bovina são classificados como material Categoria IC (ex. “Tecidos sem infectividade detectada”)

### **AS PRECAUÇÕES A ADOTAR EM CASO DE ALTERAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO PRODUTO MÉDICO:**

Se o produto estiver danificado não deve ser utilizado, devendo ser descartado.

**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