

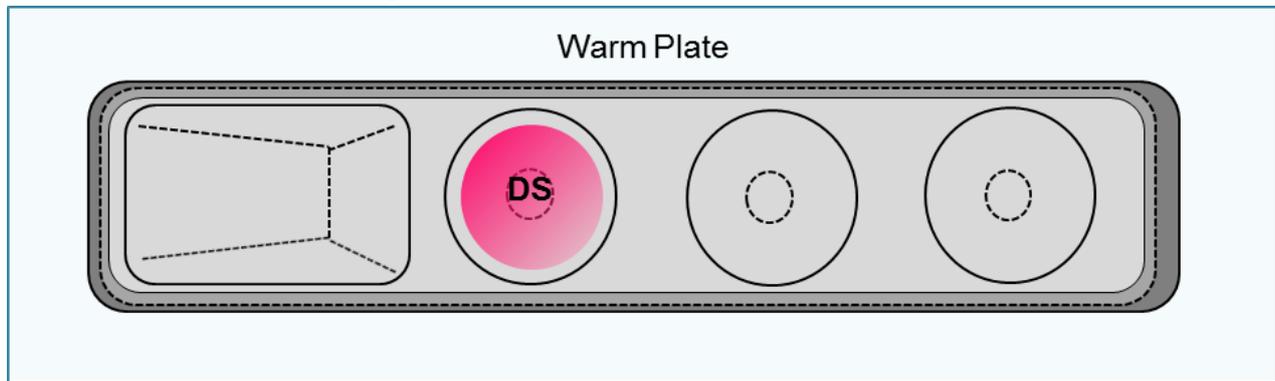
Aquecimento (Warming)

Materiales

- Kit de Vitrificação Cryotech
 - Solução de aquecimento (TS): 1 frasco de 1,8 ml
 - Solução de diluição (DS): 1 frasco de 0,5 ml
 - Solução de Lavagem (WS): 1 frasco de 1ml
 - 1 Placa de degelo com 4 poços
- Lupa estereoscópica (desligue placa aquecedora)
- Cronômetro
- Micro-pipeta para 300µl

Preparação

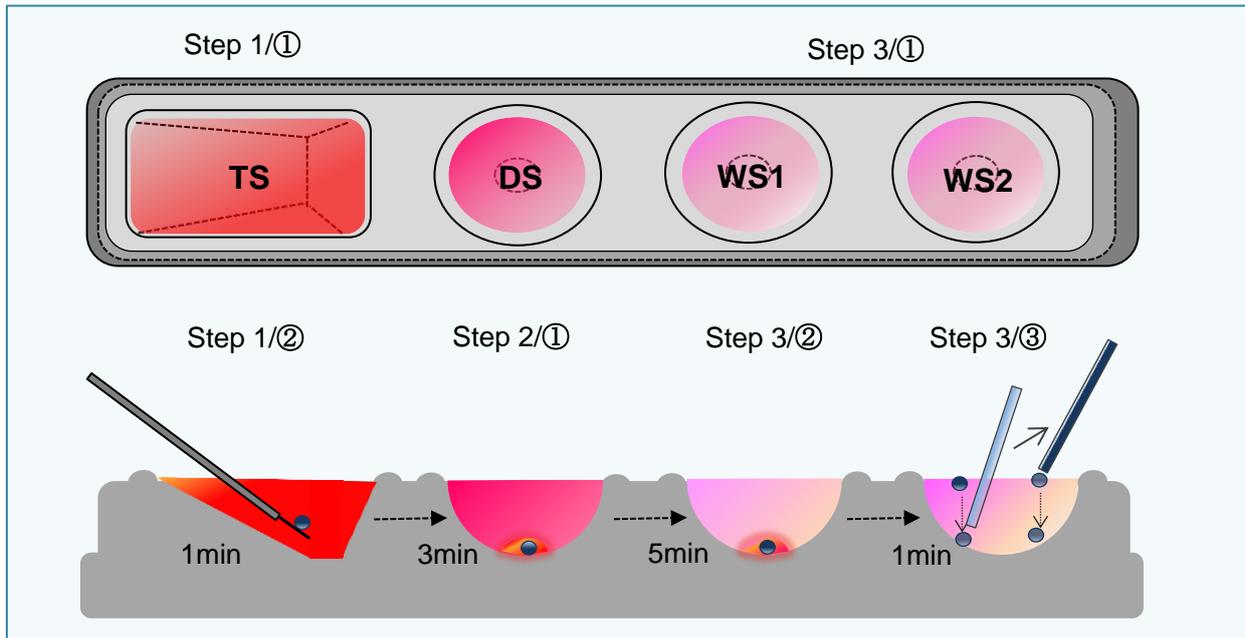
Fig. 7. Preparar a placa de aquecimento



1. Coloque a placa de aquecimento (4 poços) e o frasco TS (fechado) na incubadora a 37° C, 3 horas antes do procedimento (recomenda-se durante a noite).
2. Coloque o frasco de DS e WS à temperatura ambiente (25 ~ 27° C) pelo menos 1 hora antes de usar.
3. Prepare o nitrogênio líquido.
4. Separe a palheta Cryotech da paciente em um recipiente contendo nitrogênio líquido preparado para o procedimento (todas as Cryotechs devem estar submersas).
5. Retire a placa de aquecimento da incubadora e encha o segundo poço com 300 µl de DS (Fig. 7.)

Aquecimento (Warming) (1 min)

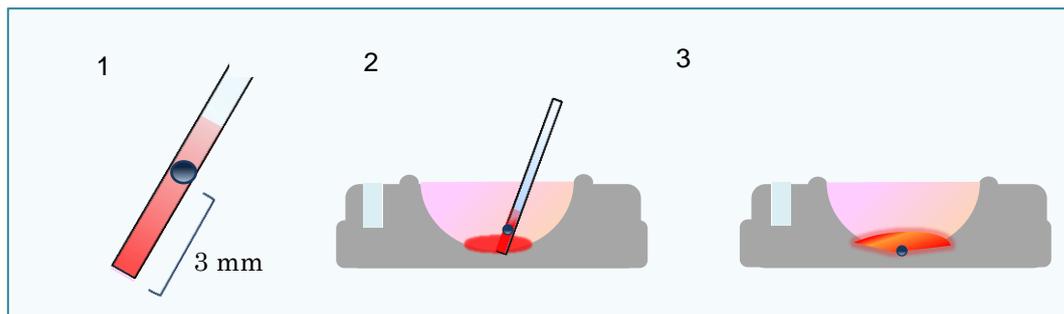
Fig.8. Procedimento para aquecimento (Step 1-3)



1. Remova o TS da incubadora e despeje o conteúdo no TS no poço retangular (1,8 ml, Fig. 8, Passo 1/1).
2. **Rapidamente (em 1 seg)**, coloque o Cryotec na cavidade do TS.
3. Comece o cronômetro. (Fig. 8, Etapa 1/2). Deve estar em TS por 1 min.
4. O óócito/embrião se separará da Cryotec por conta própria e estará livre no meio.

Diluição (3 min)

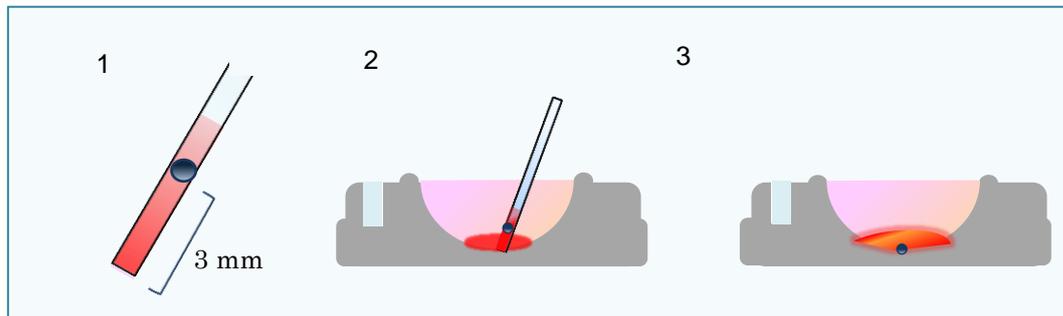
Fig. 9. Substituição gradual de soluções (TS→DS)



5. Aspirar o óócito /embrião e TS de 3 mm para dentro da pipeta (Fig. 9, 1).
6. Cuidadosamente, expelir o conteúdo da pipeta na parte inferior e no centro do DS (Fig. 9, 2), de modo que uma pequena camada de TS se forme no fundo do poço do DS (Fig. 9, 3). Aguarde 3 min (Fig. 8, Passo 2/1).
7. Enquanto isso, coloque 300 µl de solução de lavagem nos poços WS1 e WS2 (Fig. 8, Passo 3/1).

Lavagem 1 (5 min)

Fig. 10. Substituição gradual de soluções (DS→WS1)



8. Aspirar o óocito /embrião com 3 mm de DS dentro da pipeta (Fig. 10, 1).
9. Coloque suavemente a pipeta no fundo do poço WS1 (Fig. 10, 2), de modo que uma pequena camada de DS se forme no fundo do poço WS1 (Fig. 10, 3). Observe a morfologia do óocito /embrião e lembre-se disso. Apague a luz e aguarde 3 minutos.
10. Aguarde 5 min (Fig. 7, Passo 3/2).
11. Após esses três minutos, avalie a sobrevivência do óocito /embrião comparando a morfologia com a mesma três minutos atrás. Se for um blastocisto, levará mais 3 horas para recuperar seu blastocele.
12. Aguarde 5 minutos no total (Fig. 8, Passo 3/2).

Lavagem 2 (1 min)

13. Aspire o óocito /embrião com o mesmo volume de WS1.
14. Coloque o óocito /embrião na superfície do poço WS2 (Fig. 8, Passo3 / 3).
15. Quando o óocito/embrião afundar no fundo do poço, aspire novamente e coloque-o na superfície. Repita esse processo por mais 1 vez.
16. Finalmente, coloque o óocito /embrião ao seu meio de cultura para a recuperação final e ICSI ou ET.

Após o aquecimento, 2 horas de cultura são recomendadas para óocitos antes da ICSI e 3 horas para que os embriões recuperem sua blastocele.