



# **MÉTODO CRYOTECH**

## Manual de Uso

“Para oócitos e embriões”



## Vitrificação

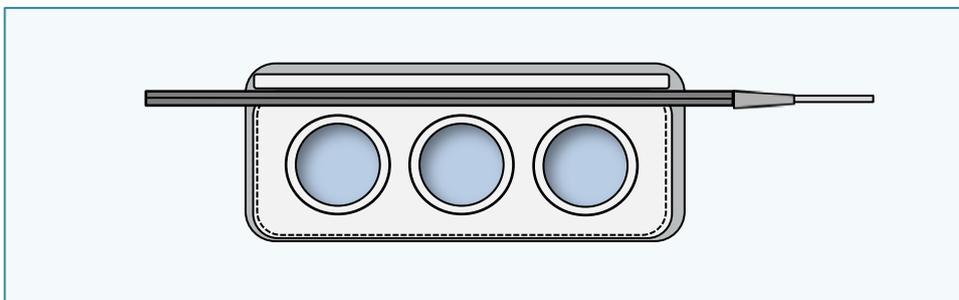
### Materials

- **Kit de vitrificação Cryotech**
  - Solução de equilíbrio (ES) – 1 frasco de 1,0 ml
  - Solução de equilíbrio (VS) – 2 frascos de 1,0 ml
  - 4 Cryotecs (Palhetas)
  - 3 placas de vitrificação com 3 poços
- Lupa Estereomicroscópio (sem aquecimento)
- Cronômetro
- Tesoura
- Micropipetas de 300 µl

### Preparação

1. Coloque os frascos de ES em temperatura ambiente (25 - 27°C) com no mínimo 1 hora antes da vitrificação;
2. Abra a embalagem dos meios com 1 tesoura. Escreva as informações necessárias da paciente na Palheta e prepare a placa de vitrificação (Fig 1);

Fig.1. Vitri Plate with Cryotec



3. Prepare o Nitrogênio para o uso;
4. Retire os óvulos da incubadora contendo os oócitos/embriões;

### Equilibration (12 – 15 min)

1. Coloque 300µl de ES e 300µl de VS respectivamente em cada poço da placa (Fig. 2) Coloque a tampa na placa de vitrificação imediatamente.

Fig. 2.

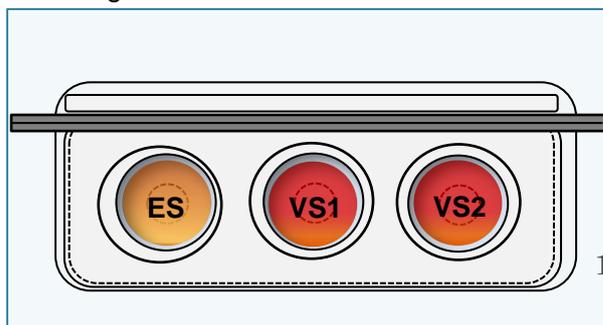
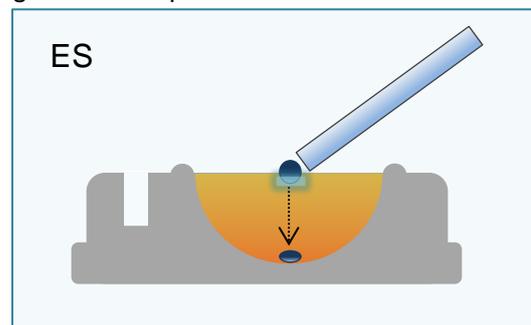


Fig. 3. ES Equilibration

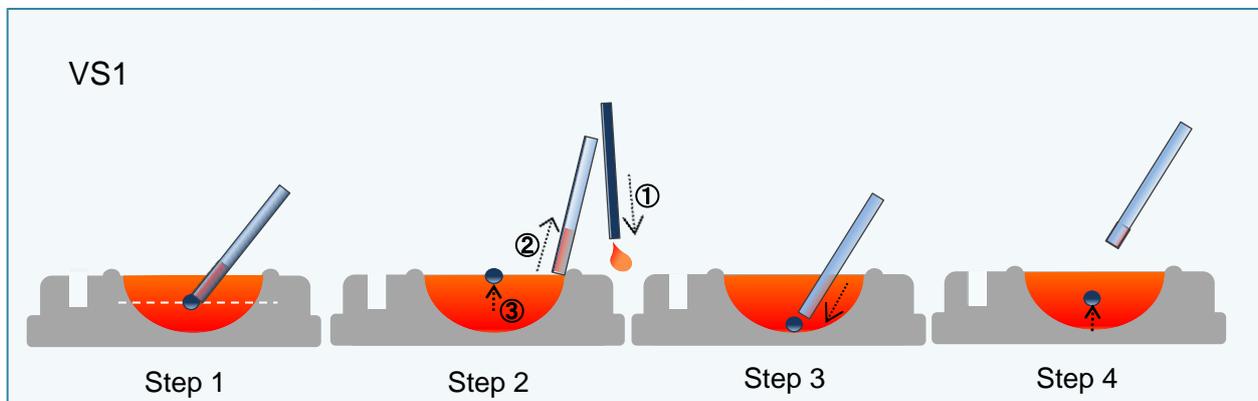


2. Aspire os oócitos/embriões com uma pipeta pasteur.
3. Coloque os oócitos/embriões com pouca quantidade de meio (cultivo) na superfície do da primeira solução (ES). Comece a cronometrar. Os oócitos/embriões lentamente irão para o fundo da placa. Nesse processo eles irão encolher aumentando o espaço perivitelino (Fig 3).
4. Coloque a tampa e espere que se recuperem voltando para sua forma original. Quando os oócitos/embriões se recuperarem completamente seu volume, finaliza-se a fase de equilíbrio.

Se não for observado a completa recuperação, continue o procedimento até completar 15 minutos para oócitos e blastocistos (160-200µm de diâmetro) e 12 minutos para embriões de 4-8 células.

### Vitrificação 1 (30-40seg)

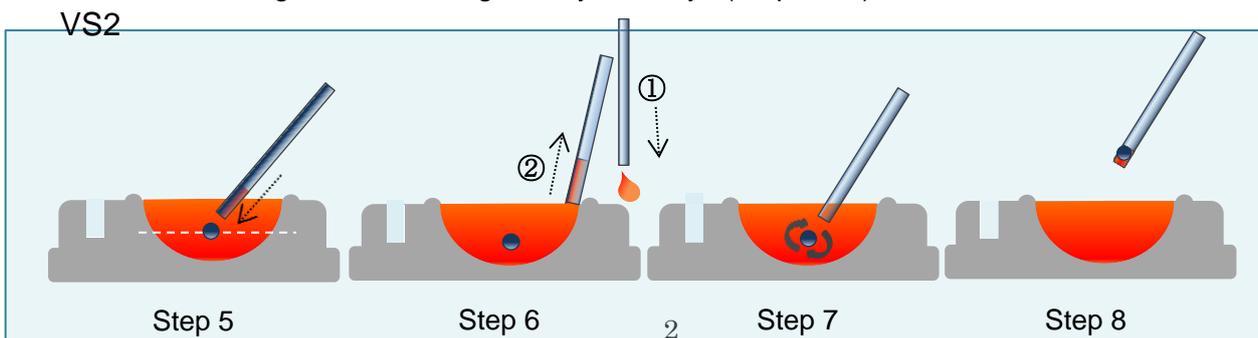
Fig. 4. VS 1 washing of oocyte/embryo (Step 1 – 4)



1. Aspire o oócito/embrião com pouco meio ES com a pipeta.
2. Coloque o oócito/embrião na metade da profundidade do VS1 (Fig 4- passo 1)
3. Lave bem a pipeta (passo 2/1). Aspire o meio VS1 lavando bem a pipeta (passo 2/2).
4. O oócito/embrião flutuará imediatamente até a superfície do VS1 (Passo 2/3)
5. Retire o oócito/embrião da superfície e deposite no fundo.
6. O oócito/embrião flutuará suavemente até a metade da profundidade do poço (passo 4)
7. Lave a pipeta desprezando o meio VS1 e aspire o meio VS2. Aspire o oócito/embrião colocando na ponta da pipeta.

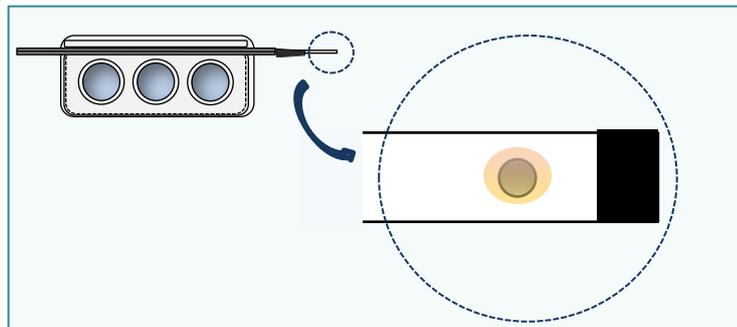
### Vitrificação 2 (10-20 seg)

Fig.5. VS2 washing of oocyte/embryo (Step 5 – 8)



8. Coloque o oócito/embrião na metade da profundidade do VS2 (passo 5)
9. Despreze o meio da pipeta (passo 6/1) e aspire meio VS2 fresco (passo 6/2)
10. Homogenize o meio VS2 ao redor do oócito/embrião até a dissolução total do meio e **verifique se o oócito está contraído e não flutua.**
11. Coloque o oócito/embrião na ponta da palheta com o mínimo de volume de VS2 (recomenda 1 oócito/embrião por Cryotech) (Fig 6).
12. Imediatamente mergulhe a Cryotech em nitrogênio líquido
13. Coloque a capa da palheta sem retirar do nitrogênio líquido

Fig.6. oócito/embrião no Cryotech



**Note 1**

Use uma pipeta pasteur tamanho certo.

- 140-150  $\mu$  m para embrião em estágio de oócito e clivagem.
- 160 ~ 200  $\mu$  m para blastocisto

**.Note 2**

Melhor tempo de vitrificação do blastocisto: o tamanho (diâmetro) deve estar entre 160 ~ 220  $\mu$ m para uma sobrevivência perfeita após a vitrificação.