



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618978-4 A2**

(22) Data de Depósito: 21/11/2006
(43) Data da Publicação: 20/09/2011
(RPI 2124)



* B R P I O 6 1 8 9 7 8 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
A01N 1/02

(54) Título: AUMENTO DA VIABILIDADE E TOLERÂNCIA À TENSÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO VIÁVEL

(30) Prioridade Unionista: 22/11/2005 HU P0501079

(73) Titular(es): Sempre Ltd.

(72) Inventor(es): András Horváth, Csaba Pribenszky, Miklós Molnár

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006054358 de 21/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/060608de 31/05/2007

(57) Resumo: AUMENTO DA VIABILIDADE E TOLERÂNCIA À TENSÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO VIÁVEL. A presente invenção refere-se a um método para o aperfeiçoamento da tolerância à tensão e/ou viabilidade de material biológico viável e manipulação do dito material compreendendo aplicação de pressão hidrostática ao dito material biológico; manutenção do dito material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado; liberação da pressão hidrostática; e manipulação do dito material para qualquer fim desejado de acordo com qualquer protocolo útil. A manipulação do dito material biológico incorpora quaisquer técnicas, protocolos que são aplicáveis no campo de técnicas reprodutivas assistidas, manipulações biotécnicas e/ou biotecnológicas.



PI0618978-4

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AUMENTO DA VIABILIDADE E TOLERÂNCIA À TENSÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO VIÁVEL**".

5 A presente invenção refere-se a um método de aperfeiçoamento de viabilidade e/ou tolerância a tensão de material biológico viável e uso do dito material compreendendo a aplicação de pressão hidrostática ao dito material biológico; manutenção do dito material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado; liberação da pressão hidrostática; e uso do dito material para qualquer finalidade desejada de acordo com qualquer protocolo útil. O uso do dito material biológico incorpora 10 quaisquer técnicas, protocolos que são aplicáveis no campo de técnicas reprodutivas assistidas, manipulações biotécnicas e/ou biotecnológicas.

Antecedentes da Técnica

15 O efeito da pressão hidrostática como um tensionador em ligação com tolerância a tensão aumentada e proteínas de impacto foi estudado em condrócitos, levedura e bactérias, mas não ainda em gametas e embriões.

20 Os mecanismos fisiológicos pelos quais microorganismos se adaptam a tensão subletal ainda não são bem entendidos. Estudos recentes descrevem que instabilidades causadas por impacto a frio subletal na síntese de proteína normal em bactérias são sofridas pela síntese de proteínas de impacto a frio assim chamadas (CSPs) (Phadtare e outros, 1999). Essas CSPs são suspeitas de ter muitas funções tais como chaperonas de RNA (Graumann and Marahiel, 1999) ou ativadores de transcrição (LaTena e outros, 1991); é admitido que elas podem desempenhar um papel de proteção 25 contra congelamento (Wouters e outros, 1999). Outras investigações verificaram que a produção de CSPs é induzida não apenas por impacto a frio, mas também por outros tensionadores ambientais. Em *Escherichia coli*, por exemplo, um tipo de CSP é produzida por tensão nutricional (Yamanaka e 30 outros, 1998).

Uma outra experiência mostrou que tratamento com alta pressão hidrostática provocou a produção de certas proteínas induzidas a frio e proteína

de impacto a calor (Welch e outros, 1993). Uma vez que tanto tratamento com impacto a frio e tratamento com alta pressão aumentam níveis de CSP, experiências foram conduzidas sobre a possibilidade de proteção cruzada. Wemekamp-Kamphuis e outros (2002) verificaram que o nível de sobrevivência depois da pressurização de monocitógenes *Listeria* impactados a frio era 100 vezes mais alta do que aquela das células que se desenvolvem a 37°C.

Pressão hidrostática na faixa de 30-50 Mpa usualmente inibe o crescimento de vários organismos: a iniciação de replicação de DNA é um dos processos intracelulares mais sensíveis a pressão (Abe e outros, 1999). Os efeitos variam em severidade dependendo da magnitude e duração de compressão (Murakami and Zimmerman, 1973). A membrana de célula é observada como um sítio primário de dano de pressão (Palou e outros, 1997). Tratamento com alta pressão hidrostática pode alterar a funcionalidade de membrana tal como transporte ativo ou permeabilidade passiva e, portanto, pode perturbar o equilíbrio físico-químico da célula (Yager and Chang, 1983; Aldridge and Bruner, 1985; Macdonald, 1987; Schuster and Sleytr, 2002; Routray e outros, 2002). A aplicação da pressão pode levar a mudanças na estrutura de proteína, incluindo conformações parcialmente ou totalmente não desdobradas. Pressão pode causar a desnaturação de proteínas (Schmid e outros, 1975; Weber and Drickamer, 1983; Jaenicke, 1991; Gross and Jaenicke, 1994; Silva e outros, 2001). Relatórios recentes afirmam que pressão hidrostática aumenta a produção de proteínas de impacto (Welch e outros, 1993; Wemekamp-Kamphuis e outros, 2002).

Os processos físicos ou bioquímicos a condições de pressão alteradas são regulados pelo princípio de Le Chatelier: todas as reações que são realizadas por uma aceleração de diminuição de volume consideravelmente (Murakami and Zimmerman, 1973; Welch e outros, 1993; Palou e outros, 1997). O acúmulo dos efeitos de pressão é letal além de um certo nível: enquanto mudanças irreversíveis de algumas biomoléculas acontecem a pressões mais altas, a 300 Mpa a maioria das bactérias e organismos multicelulares morrem. Entretanto tardígrados - em seu estado ativo eles morrem

entre 100 e 200 Mpa - podem sobreviver até 600 Mpa se eles estiverem em um estado desidratado (Seki and Toyoshima, 1998). Uma publicação recente mostra que sistemas biológicos são capazes de tolerar pressões altas contanto que a pressão seja reduzida lentamente (Johnson e outros, 1954).

- 5 Pribenszky e outros (2003, 2004) também exploraram a possibilidade de recuperação dos embriões pressurizados e verificaram que liberação gradual de pressão significativamente aumenta a sobrevivência.

Em respostas a vários estímulos de tensão, genes de impacto a calor são induzidos a expressar proteínas de impacto a calor (HSPs). Estudos anteriores revelaram que a expressão de genes de impacto a calor é regulada tanto no nível transcrito quanto pós-transcrito, e a indução transcrita rápida de genes de impacto a calor envolve a ativação do fator de transcrição específico, fator de impacto a calor 1 (HSF1). Além do mais, a indução transcrita pode variar na intensidade de cinética de um modo dependente de tipo de célula e de sinal. Kaarniranta e outros (1998) demonstraram que carregamento mecânico na forma de pressão hidrostática aumenta expressão de gene de impacto a calor em células de tipo condrócito de ser humano. A resposta a HHP contínua foi caracterizada pelos níveis de proteína e mRNA elevados de HSP70, sem ativação de HSF1 e indução transcrita de gene de hsp70. A expressão aumentada de HSP70 foi mediada através da sensibilização de moléculas de mRNA de hsp70. De modo interessante, em contraste com a pressão estática, carregamento hidrostático cíclico não resultou na indução de genes de impacto a calor. As constatações de Kaarniranta e outros (1998) mostraram que a expressão de gene de hsp70 é regulada pós-transcritivamente sem indução transcrita em células de tipo condrócito na exposição à alta pressão hidrostática contínua. Eles sugeriram que a regulação pós-transcritiva na forma de estabilização de mRNA de hsp70 provê um modo adicional de regulação de gene de impacto a calor que deve provavelmente ser de importância significativa em certas formas de tensão.

Anteriormente, os presentes inventores verificaram que uma alta pressão hidrostática (HHP), de impacto subletal, significativamente aperfeiçoa a

sobrevivência pós-congelamento de blastócitos de camundongo congelados (Pribenszky e outros, 2005a, WO 2005022996). Similarmente, na criopreservação de sémen, a motilidade média pós-congelamento era significativamente superior com pré-tratamento com pressão em cada um dos sémens bovino pressurizados em comparação com as amostras congeladas sem pressurização anterior. O resultado claramente descreve o efeito benéfico de um tratamento com pressão anterior para a motilidade pós-congelamento de sémen de touro criopreservado (Pribenszky e outros, 2005b). Outras investigações para a exploração da mudança bioquímica e base biológica mudam durante o processo de HHP revelarão o mecanismo de seus efeitos protetores. Esses estudos, no entanto, envolvem a criopreservação do material biológico depois do pré-tratamento de HHP, que é claramente impossível, ou de baixa eficácia com uma variedade de material biológico.

O processo de resfriamento ou armazenagem de sémen a temperaturas acima de 0°C é bem estabelecido para armazenar espermatazoides por um período curto de tempo [Hackett, e outros, 1982; Pinto, 1999; O'Shea e outros, 1964]. Com o tratamento (diluição) é armazenagem ótima de sémen à temperaturas ótimas, o sémen pode ser inseminado com resultados de fertilidade aceitáveis (mas com taxas de concepção obviamente reduzidas em comparação com inseminação de sémen fresco) no período de 1-2 dias pós-coleta [Gill e outros, 1970; Goodman and, Cain, 1993; Harrop, 1954; Ijaz and Ducharme, 1995; Katila e outros, 1997]. Esses métodos seguem etapas básicas muito similares:

1. coleta de sémen.
2. diluição de sémen à temperatura de corpo.
3. configuração opcional do sémen diluído. Reprorrogamento do sémen para ajustar a concentração ótima do esperma.
4. manter o sémen (re)prorrogado à temperatura ambiente ou 4-5°C ou qualquer temperatura que esteja acima do ponto de congelamento da amostra.
5. inseminação do sémen.

Similarmente à espermatazoides que sofrem uma perda de via-

bilidade durante a armazenagem, a capacidade de sobrevivência de embriões ou ovócitos também reduz uma vez removido do seu envolvente fisiológico materno (por exemplo, por cultura *in vitro*, ativação, transferência de embrião, divisão, determinação de sexo, biopsia, maturação *in vitro*, ICSI, clonagem ou qualquer tipo de procedimento biológico). Por essa razão, aperfeiçoamento da capacidade de viabilidade/sobrevivência de gametas e embriões antes ou depois de qualquer procedimento incluindo armazenagem, inseminação ou transferência rotineira tanto quanto o procedimento biotecnológico mais complexo é de maior importância científica ou econômica.

10 Similarmente, por exemplo, durante a preservação de microorganismos, tais como bactérias (por exemplo, secagem por congelamento), a viabilidade de microorganismos é grandemente comprometida. Aperfeiçoamento da eficácia de qualquer processo que se junta com a viabilidade aperfeiçoada porta significância científica e econômica imensa.

15 Como está claro a partir do exposto acima, há ainda uma necessidade da técnica para o aperfeiçoamento da viabilidade de material biológico que é amplamente usado nos protocolos biológicos.

Os presentes inventores surpreendentemente verificaram que por aplicação de um desafio de pressão hidrostática a viabilidade de materiais biológicos pode ser aperfeiçoada significativamente, e pela aplicação do método, muitos estados dos protocolos biotecnológicos da técnica podem ser realizados mais eficazmente. O presente relatório mostra uma ampla faixa de exemplos nessa constatação: depois da aplicação do presente método a transferência de embrião ou inseminação de embrião, a taxa de concepção e taxa de nascimento aperfeiçoaram; por aplicação do presente método a ovócitos, sua tolerância a tensão aumentou grandemente, que resultou em taxa de clivagem aperfeiçoada e taxa de formação de blastócito mais alta; por aplicação do presente método a sémen, e então seguindo o estado da técnica de diluição e armazenagem, a motilidade dos espermatozóides foi preservada por um período de tempo significativamente mais longo.

30 Também surpreendentemente que os aperfeiçoamentos eram substanciais mesmo quando se evitando aplicar temperaturas abaixo do

ponto de congelamento do meio durante qualquer estágio de armazenagem e/ou manipulação do material biológico. Essa constatação tem aplicações práticas significativas para a usabilidade dos presentes métodos de HHP e similares.

5 Nesse contexto, deve-se enfatizar que o presente conceito inventivo igualmente se aplica a qualquer procedimento ou protocolo biotécnico/biotecnológico diferente usado nas técnicas reprodutivas assistidas (ART) e outros procedimentos, e a escolha daqueles não é limitada com relação à invenção. A única etapa necessária para incluir nos protocolos aperfeiçoados é a etapa de desafio de pressão hidrostática; os parâmetros dos quais
10 pode ser facilmente otimizado por uma pessoa versada na técnica quando após os ensinamentos da presente descrição.

 Uma vez que congelamento de sêmen fornece sobrevivência pós-congelamento pobre de espermatozóides nos javalis (e também cavalos), a ferramenta mais comum de reprodução nessas espécies é a inseminação de sêmen fresco, prorrogado e resfriado e prorrogado e esfriado. Pelo
15 uso de sêmen de pré-tratamento com HHP é significativamente melhor preservado na dada temperatura, e também, o tempo de armazenagem com qualidade mais alta é consideravelmente aumentada.

20 Similarmente, produção de embrião *in vivo* e *in vitro*, cultura de embriões *in vitro*, sexo, divisão, transferência de gene, transferência de embrião, maturação de ovócito, ativação, ICSI, clonagem ou qualquer procedimento biotécnico/biotecnológico no embrião, ovócito ou esperma grandemente reduzem sua capacidade de viabilidade/sobrevivência. Como uma
25 extrapolação das características acima, pelo uso de gametas e embriões de pré-tratamento com HHP entrarão em qualquer tipo de procedimento biotécnico/biotecnológico ou tecnologia reprodutiva assistida (ART) com uma capacidade de sobrevivência aumentada.

Descrição da Invenção

30 Correspondentemente, a presente invenção refere-se a um método para o aperfeiçoamento de viabilidade e/ou tolerância à tensão de material biológico viável e uso do dito material compreendendo

(a) aplicação de pressão hidrostática ao dito material biológico viável;

(b) manutenção do dito material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo determinado;

5 (c) liberação da pressão hidrostática;

(d) uso do dito material para qualquer finalidade desejada de acordo com qualquer protocolo útil, com a condição de que o dito uso não compreende criopreservação.

10 Em uma concretização, pressão usada no método de acordo com a invenção está na faixa de 1 a 200 Mpa. Em concretizações preferidas, a pressão está de preferência na faixa de 10 a 100 Mpa, mais de preferência de 20 a 75 Mpa, e com mais preferência de 30 a 60 Mpa.

15 Em uma outra concretização, a pressão hidrostática usada no método de acordo com a invenção é aplicada por um período entre "instantâneo" e 300 minutos. Em concretizações preferidas, a pressão é aplicada de preferência por um período de tempo entre 0,001 segundos e 600 minutos, de preferência de 1 segundo a 300 minutos, mais de preferência de 10 segundos a 150 minutos, com mais preferência de 20 segundos a 90 minutos, e ainda mais de preferência de 30 segundos a 60 minutos.

20 Em outras concretizações, o período de tempo para a liberação da pressão está entre 10 s e 2 horas, ou entre 1 min e 1 hora, ou em outros casos 10 min e 30 min. A liberação de pressão pode ser instantânea.

25 Em uma concretização preferida, a invenção refere-se a um método em que a pressão é aplicada, guardada e liberada de acordo com um perfil de pressão predeterminado.

Em uma outra concretização preferida, a invenção refere-se a um método em que a pressão é aplicada, guardada e liberada de acordo com um perfil de temperatura predeterminado.

30 Em uma concretização preferida, o método de acordo com a invenção é usado em ligação com gametas e embriões selecionados do grupo que consiste em ovócitos, espermatozoides, zigotos, mórulas, blastócitos, embriões, células-tronco de um animal vertebrado.

Concretizações preferidas referem-se a um método em que o dito animal vertebrado é um peixe, pássaro ou um mamífero, de preferência bovino, eqüino, caprino, ovino, suíno, outros animais de criação, animais de estimação, primatas, incluindo ser humano.

5 Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se a um método em que o dito material biológico é uma cultura de microorganismos.

Em concretizações preferidas da presente invenção, a dita cultura de microorganismo é uma cultura bacteriana.

10 A presente invenção ulteriormente refere-se a qualquer método como descrito acima, em que a armazenagem e manipulação do dito material biológico incorpora quaisquer técnicas, protocolos que são aplicáveis no campo de técnicas reprodutivas assistidas, manipulações biotécnicas e/ou biotecnológicas.

15 Em uma concretização preferida, o protocolo usado no método de acordo com a presente invenção é a secagem por congelamento.

Em um outro aspecto, o método da presente invenção aplicado para aperfeiçoar a tolerância a tensão do material biológico, em que a tolerância contra temperatura aumentada é aperfeiçoada.

20 A presente invenção é descrita em mais detalhes por uso de embriões de camundongo, espermatozóides de javali, ovócitos de porco e duas espécies de bactérias para a finalidade de demonstração do conceito inventivo. Seria evidente que os procedimentos descritos igualmente se aplicam a todos os gametas e embriões de mamífero, ave ou peixe, que são
25 candidatos de qualquer espécie de ART, ou mais em geral, a qualquer tipo de material biológico viável usável nos procedimentos biotécnicos ou biotecnológicos. Em consideração a acesso e manipulações fáceis, embriões de camundongo, sémen de javali e touro, ovócitos de porco e duas espécies de bactérias foram selecionados como os indivíduos da investigação detalhada.

30 Em consideração a interpretação e extrapolação fácil, procedimentos de ART simples foram selecionados: transferência de embrião, inseminação artificial, ativação *in vitro* de ovócitos e armazenagem *in vitro* de sémen. Tan-

to quanto a prova de experiência de conceito com microorganismos é envolvida, secagem por congelamento de bactéria foi selecionada para apresentar o efeito benéfico de pré/tratamento de alta pressão hiroestática. Esses procedimentos são os protocolos básicos de bacteriologia, procedimentos de
5 ART e biotecnológicos ou biotécnicos subjacentes de sua aplicabilidade de pesquisa, cuidado de saúde e industrial. No entanto, no método de acordo com a invenção e similarmente na presente descrição, o termo "embrião de camundongo" ou "sémen de touro ou javali" pode ser usado intercambiavelmente com o termo "gameta ou embrião". Por exemplo, estágios pré- e
10 pós-implantação de embriões, ovócitos e espermatozoides de animais vertebrados e ser humano podem ser igualmente aplicados no presente método.

No contexto da presente invenção, a expressão "material biológico viável" refere-se em geral a uma parte de ou originando-se de um organismo vivo que tem uma capacidade para viver, desenvolver, ou germinar
15 sob condições favoráveis. Sem limitação, o material biológico viável pode ser uma célula, cultura de célula, amostra de tecido, cultura de tecido, órgão, e similares.

Com relação a microorganismos, o termo refere-se a um órgão que é microscópico, isto é, demasiadamente pequeno para ser visível a olho
20 nu. Microorganismos podem ser bactérias, fungos, archaea ou eucariotos. Microorganismos são freqüentemente descritos como organismos unicelulares ou de célula única; no entanto, alguns protistas unicelulares são visíveis a olho nu, e algumas espécies multicelulares são microscópicas.

Como organismos eucarióticos altamente desenvolvidos, embriões de camundongo são mais suscetíveis ao efeito de pressão hidrostática
25 do que tardígrados e bactérias. O primeiro objetivo, portanto, é estabelecer as características básicas de embriões de camundongo sob pressão com relação a sua morfologia e sobrevivência.

Experiências cuidadosamente designadas foram conduzidas
30 para investigar a tolerância a pressão de embriões de camundongo. A escolha da pressão e a escala de tempo usadas foram definidas para dar à faixa aplicável mais ampla para as últimas aplicações práticas. Portanto, a pres-

são para o uso no método de acordo com a invenção é selecionada na faixa de 1 Mpa a 150 Mpa. Mais particularmente, a pressão hidrostática que pode ser aplicada aos embriões de estágio de blastócito prorrogados é de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 Mpa, ou qualquer valor entre essas faixas intermediárias. Similarmente, um período de tempo amplo pode ser selecionado para os embriões de camundongo para serem mantidos sob alta pressão hidrostática. Mais particularmente, os embriões de camundongo são mantidos sob a pressão selecionada por um período de tempo entre 1 s e 6 horas, mais especificamente de 1 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min, 300 min ou 360 min. O tempo que os embriões sobrevivem sob pressão reduz com aumento de pressão.

Embriões podem sobreviver uma quantidade substancial de pressão sem qualquer mudança visível em sua morfologia (por exemplo, 90 Mpa por 1 s ou 30 Mpa por 2 h). Os embriões compactados dependem da magnitude e da duração do tratamento de pressão aplicado. Sem limitar o escopo da invenção pela teoria, adota-se que a pressão não pode ser diretamente responsável pela remoção de água dos blastócitos. Com base nos documentos citados, a compactação dos embriões era devido às consequências de produção de pressão induzida de diferentes proteínas (proteína de impacto a frio, CSPs), alterações reversíveis na estrutura de proteína e processos metabólicos. Embriões compactados poderiam recuperar sua morfologia normal depois de 4-5 horas de cultura *in vitro*, e resumem similaridade de desenvolvimento em controles (por exemplo, embriões desafiados por 90 Mpa por 30 min ou 30 Mpa por 3 h).

Embriões oriundos da "faixa subletal" mencionada acima (por exemplo, embriões compactados) podem de preferência ser selecionados para a última transferência ou qualquer procedimento de ART ou biotecnológica. Depois da pressurização, blastócitos expandidos se tornam compactados e permanecem nessa forma por 3 - 4 horas, então eles reexpandem. Com base nesse fenômeno, embriões foram tratados com pressão antes

que pudessem ser selecionados. Uma vez que as mudanças morfológicas dos embriões e os efeitos benéficos e/ou características e/ou a produção aumentada de proteínas induzidas por pressão diferente, o exame dessas proteínas podem ser indicativos da alta pressão hidrostática aplicada ao material biológico antes de qualquer outro processo.

5 Quanto mais alta a magnitude da pressão, menos tempo os embriões sobrevivem. Impacto de pressão que excede uma certa magnitude e duração causa mudanças irreversíveis: embriões se tornam desintegrados depois de duas horas de cultura *in vivo* ou já foram desintegrados depois da
10 decompressão (por exemplo, embriões desafiados por 90 Mpa por 2 h ou 30 Mpa por 5 h). A pessoa versada na técnica seria capaz de determinar essas pressões limite e tempos limite por experimentação rotineira com relação ao material biológico específico usado.

Será apreciado que a taxa de sobrevivência dos embriões pressurizados pode ser aumentada por sua decomposição gradual. Estudos mostraram que a taxa de sobrevivência dos embriões pressurizados aumenta notavelmente se eles forem recuperados gradualmente. Enquanto 60 minutos a 90 Mpa era letal para todos os embriões, 80% sobreviveram quando decomposição gradual por 120 min foi usada. O tempo de decompressão é
15 também uma característica da presente invenção que é até que a pessoa versada na técnica determinar em virtude da aplicação específica. Mais particularmente, os embriões de camundongos mantidos sob a pressão selecionada são descomprimidos por um período de tempo entre 1 s e 4 horas, mais especificamente de 1 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, 1 min, 2 min, 3
20 min, 4 min, 5 min, 6 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 70 min, 80 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min ou 240 min.

Será apreciado pela pessoa versada na técnica que o tratamento com pressão de acordo com a presente invenção pode ser realizado de
30 acordo com qualquer perfil de pressão desejado. Portanto, a dependência de tempo da pressão como ele aplicado, mantido e liberado pode variar de acordo com as curvas de tempo - pressão, incluindo a totalidade de ponto de

tempo do tratamento com pressão, isto é, durante a aplicação da pressão, durante o curso do período de pressão máx., e durante a fase de liberação de pressão. É óbvio que o nível de pressão em qualquer ponto de tempo pode ser otimizado e estabelecido de acordo com experiências preliminares facilmente realizadas com base no presente ensinamento sem excesso de experimentação.

Em uma outra concretização preferida, o método da presente invenção pode ser realizado de acordo com um perfil de temperatura determinado. O termo "perfil de temperatura" refere-se ao perfil de tempo - temperatura como é mensurável ou estabelecido durante o curso do tratamento de pressão, e é independentemente controlável a partir da pressão aplicada. Em concretizações preferidas, o tratamento com pressão realizado em uma única temperatura, no entanto, o material biológico de interesse pode ditar o uso de temperaturas diferentes nos estágios ou partes diferentes do tratamento com pressão. Uma temperatura estabelecida pode ser qualquer temperatura, por exemplo, temperatura ambiente, o tratamento de corpo nativo onde o material biológico é originado de uma temperatura levemente elevada da dita temperatura de corpo nativo, e similares. A pessoa versada na técnica pode facilmente determinar a aplicabilidade de qualquer dado perfil de temperatura por análise da eficácia do tratamento com pressão em comparação com uma experiência de controle.

Sem estar limitado pela teoria, uma explicação possível dessa característica poderia ser que uma quantidade considerável de CO_2 é gerada sob pressão (Abe and Horikoshi 1995). A hidratação e ionização de CO_2 (HCO_3^- e H^+) são facilitadas por pressão elevada uma vez que a reação é realizada por uma diminuição em volume (-0,26 ml/mol) de um modo dependente da magnitude da pressão aplicada (Palou e outros 1997, Welch e outros, 1993). O dióxido de carbono intracelularmente produzido instantaneamente se dissolve, e então dissocia para dar HCO_3^- e H^+ , assim, também redução do pH intracelular (Abe and Horikoshi 1995, 1997, 1998, Abe e outros 1999). Pode ser assumido que o equilíbrio mantido pela pressão elevada é letal para os embriões a pressão atmosférica. Pode também levantar-se

a hipótese de que a presente diminuição de pressão causa liberação elevada de CO₂ de sua forma hidratada e ionizada do citoplasma, causando morte imediata dos embriões. Na condição de que um certo tempo de descompressão, as proteínas de membrana de plasma (H⁺-ATPase) (Schmid e outros 1975, Péqueux and Gilles 1978) reversivelmente inativaram por pressão hidrostática elevada, começam a funcionar novamente, (juntamente com difusão passiva) deslocando equilíbrio gradualmente em relação ao estado fisiológico.

Depois do tratamento com parâmetros de pressurização cuidadosamente escolhidos, os embriões foram cultivados *in vitro*, então foram transferidos em mães pseudográvidas. O número de cachorrinhos que nasce depois do tratamento com pressão dos embriões era mais alto do que era alcançável sem o tratamento com pressão.

Similarmente ao tratamento de embriões, ovócitos de porco foram também pressurizados para examinar sua tolerância a pressão. Então, com parâmetros cuidadosamente selecionados, ovócitos foram pré-tratados, tensionados com um impulso elétrico 10 vezes mais do que o valor ótimo, e foram examinados quanto a clivagem e desenvolvimento ulterior até o estágio de blastócito. O número de ovócitos ativados *in vitro* que clivou e desenvolveu ulteriormente era mais alto com tratamento com pressão do que sem.

Similarmente ao tratamento de embriões, sêmen de touro e javali foi também pressurizado para examinar a tolerância a pressão de espermatozoides. Então, com parâmetros cuidadosamente selecionados, sêmen foi pré-tratado, e foi mantido *in vitro* a temperaturas diferentes. O número de espermatozoides móveis nos pontos de tempo diferentes depois que a coleta de sêmen foi mais alta com tratamento com pressão do que sem. A inseminação de sêmen de javali tratado com pressão forneceu número um pouco mais alto do que foi alcançável rotineiramente na instalação.

Similarmente aos tratamentos mencionados acima, amostras de *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* foram pressurizadas para examinar se a sobrevivência das bactérias pode ser aumentada depois da secagem por congelamento. O número de bactérias sobreviventes em parâme-

tros de pressão/tempo selecionados depois de secagem por congelamento era mais alto com tratamento com pressão do que sem.

As presentes descrições mostram o aperfeiçoamento na capacidade de viabilidade/sobrevivência de material biológico por desafio de pressão hidrostática usando-se blastócitos de camundongo, ovócitos de porco, 5 espermatozóides de touro e de javali e duas espécies de bactérias como sistemas de modelo. Isso pode ser avaliado por transferência dos embriões pressurizados, após seu tratamento para cultivar meio e/ou em receptores pseudográvidos; ou ativação *in vitro*; ou inseminação do sémen tratado ou 10 contagem da sobrevivência de bactérias depois da secagem por congelamento, respectivamente. Desenvolvimento *in vitro*, implantação e desenvolvimento uterino ulterior e clivagem e outro desenvolvimento são testes óbvios da viabilidade de embriões e ovócitos. Similarmente, a armazenagem *in vitro* e inseminação do sémen, fornecendo número mais alto de epermato- 15 zóides móveis (*in vitro*) e taxas de gravidez mais altas suportam a aplicabilidade do dito método.

A pressurização pode ser realizada por uso de qualquer dispositivo de pressurização disponível que pode ser adaptado para os protocolos de acordo com a presente invenção. Exemplos não limitantes de tais instru- 20 mentos são, por exemplo, os dispositivos descritos no WO 2005022996 ou no presente documento.

A presente invenção é ulteriormente ilustrada pelos exemplos experimentais descritos abaixo, no entanto, o escopo da invenção não será de modo algum limitado pelas concretizações específicas descritas nos e- 25 xemplos.

Exemplo 1. Sobrevivência de embriões de camundongo a pressões diferentes a temperatura ambiente, efeito de tratamento com pressão no implante e nas taxas de nascimento

Produção de Embrião e Cultura

30 Embriões de camundongo de estágio de uma célula foram coletados a partir de doadores de CB6F1 de 6-8 semanas de idade superovulados e foram cultivados a 37°C com 5% de CO₂ e umidade máxima em ar em

meios de G 1.2 e G2.2 (Vitrolife, Göteborg) no estágio de blastócito expandido.

Pressurização

5 Blastócitos foram carregados em canudos de plástico de 0,08 ml (7-9 embriões/canudo) com (M2 Sigma St. Louis, MO). Canudos, enchidos com M2 como meio de pressão, foram colocados para dentro da câmara de um dispositivo feito por encomenda que é capaz de gerar e precisamente detectar pressão hidrostática até 150 Mpa. Alcançando a quantidade desejada de pressão levou 20 segundos a 5 minutos (10 Mpa a 150 Mpa, respectivamente); a duração de liberação da pressão era de 2-4 segundos.

10 Transferência

Para avaliação *in vivo*, embriões pressurizados com 60 Mpa (600 bars) por 30 minutos foram cultivados em G 2.2 por duas horas como acima. Então, eles foram transferidos (7-12 embriões por animal) para dentro do dia 3 de receptores pseudogravídeos. Blastócitos não tratados foram transferidos como controles.

15 Avaliação análise estatística

Conclusões foram tiradas dos desafios na aparência morfológica dos embriões examinados a 400 x de ampliação durante 24 horas de cultura *in vitro* continuada, e da taxa de origem dos embriões transferidos. Morfologia microscopicamente não mudada dos blastômetros, reexpansão da blastócele e nascimento a partir da zona pelúcida foram sinais de sobrevivência *in vitro*. O número de fetos no dia 18 de dissecação das fêmeas grávidas ou nascimento de cachorrinhos saudáveis era prova de sobrevivência *in vivo* dos embriões. As taxas de sobrevivência foram comparadas com controle por teste de chi-square.

25 Nas presentes experiências embriões foram expostos a pressões hidrostáticas diferentes de 10 a 150 Mpa (por aumentos de 10 Mpa) por várias horas, entre 1 s a 300 min, à temperatura ambiente.

30 O tratamento que excede uma certa quantidade de pressão e tempo causou mudanças morfológicas reversíveis. Os blastócitos expandidos compactados dentro da zona pelúcida: a blastocele desapareceu, o tamanho dos blastômeros reduziu mas sua integridade estrutural não mostrou

nenhuma alteração. Depois de 4-5 horas de cultura *in vitro* esses blastócitos foram reexpandidos e criados da zona pelúcida em 24 horas (a). Embriões que recebem menos impacto não mostrou nenhuma mudança morfológica e criou no período de 24 horas de cultura *in vitro* (b), enquanto embriões desafiaram com um impacto maior não expandiram do estágio compactado e desintegram no período de 2 horas, ou foram já desintegrados depois da descompressão (c).

Para a avaliação *in vivo*, embriões desafiados foram julgados "sobrevidas" (a&b) e "mortos" (c) depois de 2 horas de cultura *in vitro* depois da descompressão e foram transferidos para dentro dos receptores separadamente. Vinte e nove embriões tratados com pressão foram transferidos para mães pseudográvidas, dos quais 28 nasceram. Essa razão era mais alta do que que foi alcançável com embriões não tratados. Esse aperfeiçoamento significativo sobre o estado dos dados da técnica (por volta de 85%) também mostra a robustez do pré-tratamento com pressão. Quando os ótimos parâmetros de tempo e pressão são aplicados, o aperfeiçoamento da viabilidade do material biológico ainda pode ser significativo mesmo quando os valores de linha de base totalmente altos e já satisfatórios para a indústria. No entanto, no campo de ART, cada ponto de percentagem pode ter significância econômica adicionada.

Exemplo 2. Sobrevivência de espermatozóides de touro a pressões diferentes na temperatura ambiente, efeito de tratamento com pressão na prevenção do declínio de motilidade de esperma.

Embora sémen de touro seja usualmente armazenado congelado, a possibilidade do presente método foi ulteriormente testada em um sistema industrialmente importante.

Sémen de 13 touros foi diluído a uma concentração de esperma de 8×10^7 /mL com diluente AndroMed (MiniTüb, Tiefenbach, Alemanha). Esperma diluído foi carregado em canudos de 0,25 mL a 25°C. Canudos foram divididos em grupos de tratamento e grupo de controle de não tratamento. Os grupos de tratamento foram pressurizados com máquina de pressão controlada por computador (Crio-Innovation, Budapest, Hungary) com 9

perfis diferentes. Para aparelho de CASA de testagem de mobilidade total/progressiva, SpermVision Versão 3.0 (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) foi usado.

5 Foi concluído que tratamento com pressão abaixo da região de 60 Mpa (600 bars) não afeta negativamente sobrevivência de esperma. Depois de 8 horas de armazenagem de sémen à temperatura ambiente a motilidade das amostras tratadas/não tratadas foram analisadas novamente: a proporção das células móveis eram mais altas nas amostras tratadas.

10 Exemplo 3. Sobrevivência de espermatozóides de javali a pressões diferentes na temperatura ambiente, efeito do tratamento com pressão na prevenção do declínio da motilidade de esperma

15 Para ulteriormente examinar a aplicabilidade o método de acordo com a invenção, sobrevivência de espermatozóides de javali foi examinada, onde armazenagem na temperatura ambiente é pelo contrário um padrão industrial.

Coleta de Sémen

20 Sémen foi coletado a partir de javalis duas vezes por semana. A fração rica em esperma filtrada foi coletada por técnica manual servido com luva para dentro de uma garrafa a vácuo isolada de 250 ml, então esperma foi avaliado (Hancock and Hovell, 1959). As frações ricas em esperma de ejaculações com mais do que 70% de esperma móvel foram usadas.

Preparação de Sémen

25 Preparação de sémen congelada seguido um método anteriormente descrito (Almlid and Johnson, 1988; Maxwell and Johnson, 1997) com uma modificação menor. Resumidamente, o sémen foi diluído de 1:2 com 37°C de diluente de solução de descongelamento de Beltsville (BTS) na garrafa isolada então foi resfriada a temperatura ambiente (20-23°C) por 1 h depois da coleta. Depois do resfriamento, sémen foi transferido para dentro de tubos de 10 ml, foi centrifugado a temperatura ambiente por 3 min a 2400
30 x g, e a solução de sobrenadante foi descarregada. Os péletes foram res-suspensos em diluente de gema de ovo e lactose a temperatura ambiente. Então, diluente de glicerol (o segundo diluente) e pasta de Equex (Minitüb,

Tiefenbach, Alemanha) foi adicionada ao sémen para dar uma concentração final de 6% de glicerol e 0,5% de Equex. Ministras, 0,25 ml, (IMV, L'Aigle, França) foram, então, enchidos com sémen, canudos foram selados a quente. A concentração foi ajustada para prover 300×10^6 espermatozoides/ml.

5 Pressurização

Os canudos foram colocados na câmara de pressão, foram enchidos com água como um meio de pressão, do dispositivo de pressurização, e o protocolo de pressão predeterminado foi aplicado. O dispositivo de pressurização feita por encomenda era capaz de prover precisamente pressão controlada na faixa de 1 Mpa - 1000 Mpa (10-10000 bars). Foi produzido de aço inoxidável (KO 33) com o diâmetro interno de 20 x 220 mm, e foi ligado a um medidor de pressão. Um pistão, movendo na câmara de pressão gerada a pressão hidrostática. Velocidade de pressurização e despressurização era de 20 Mpa/min (200 bar/min).

15 Amostras foram pressurizadas a temperatura ambiente (TA) ou com 20, 40 ou 80 Mpa (200, 400 ou 800 bars) ou por 40, 80 ou 120 minutos. Amostras não pressurizadas foram mantidas a temperatura ambiente para o tempo correspondentemente.

Avaliação

20 Depois de 20 min de incubação, duas gotas de 5 μ l foram transferidas sobre lâminas de vidro e duas lamínulas de 22 mm x 22 mm foram aplicadas. As amostras foram inseridas no microscópio (Olympus BX 30), equipado com uma ótica de contraste de fase e de estágio de microscópio a 37°C (20X, Olympus, Japão) e 5-5 campos foram avaliados a partir de cada
25 gota por meio de aparelho de CASA, SpermVision Version 3.0 (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Espermatozoides com VSL > 10 μ m/s e AOC > 10 foram considerados móveis progressivos.

Resultados

30 Depois da análise dos parâmetros de motilidade usando-se modelo misto (fatores; tempo, pressão, data (aleatórios)), o fator de pressão provou ser significativo ($p = 0,001$, motilidade total; $p = 0,0103$, motilidade progressiva). Depois das múltiplas comparações dos tratamentos com pres-

são o impacto de tratamento de 80 Mpa (800 bars) provou ser significativo ($P < 0,001$, motilidade total; $P < 0,05$, motilidade progressiva) pior do que os outros níveis (Tabela 1.).

Tabela 1: Parâmetro de motilidade (motilidade média (erro padrão)) após os tratamentos com pressão diferentes

	40 min		80 min		120 min	
	tm	pm	tm	pm	tm	pm
200 bar	81 (4)	71,5 (6,5)	91 (2)	61 (16)	82.5 (0.5)	64 (16)
400 bar	87 (3)	73 (2)	87 (2)	52 (9)	80 (4)	63 (9)
800 bar	65,5 (6,5)	48 (2)	78,5 (3,5)	53.5 (9.5)	69.5 (3.5)	52 (10)
Pressão atmosférica	88 (2)	70 (11)	88 (1)	61 (10)	80 (1)	68.5 (8.5)

tm: motilidade total; pm: motilidade progressiva. Há 2 repetições de cada combinação de tratamento.

A seguir, foi examinado se a aplicação de tratamento com pressão afeta as taxas de motilidade de espermatozoides depois de 5 horas de tempo de aclimatização a frio por 5 horas. Um modelo misturado foi ajustado novamente com pressão, tempo e exame (com dois níveis: antes e depois do tempo de aclimatização por 5 horas), interações dos fatores de fixação, e data como um fator aleatório. Apenas a pressão e fatores de exame provaram ser significativo (Tabela 2.).

Tabela 2: Parâmetros de motilidade (motilidade média (erro padrão)) depois de 5 horas de tempo de aclimatização a frio

	40 min		80 min		120 min	
	tm	pm	tm	pm	tm	pm
20 Mpa (200 bar)	78,5 (1,66)	51,25 (7,5)	85,67 (2,33)	71,33 (5,46)	80 (2)	56,5 (4,5)
40 Mpa (400 bar)	77 (1,58)	63,25 (5,76)	78,67 (4,18)	64 (7,77)	80,5 (4,5)	74 (2)
80 Mpa (800 bar)	67 (4,53)	46,75 (4,5)	64 (0,58)	47,33 (2,19)	76,5 (1,5)	66 (1)
Pressão atmosférica	72,25 (2,56)	47,75 (10,59)	78,33 (4,1)	60 (10,21)	75 (4)	45,5 (3,5)

tm: motilidade total; pm: motilidade progressiva. Há 4, 3 e 2 repetições de

cada um dos tratamentos de pressão durante intervalos de tempo de 40, 80 e 120 minutos, respectivamente.

A motilidade total das amostras não pressurizadas (atm) reduzia significativamente, enquanto depois de tratamento de 20 e 40 Mpa (200 e 400 bars) a motilidade não reduziu depois de 5 horas de tempo de aclima-
5 400 bars) a motilidade não reduziu depois de 5 horas de tempo de aclima-
zação a frio, em comparação com a motilidade inicial.

Exemplo 4. Efeito de tratamento com pressão na capacidade de fertilização de espermatozóides de javali

Cinco porcas, já excluídas da produção, foram inseminadas com
10 sémen de javali tratado com pressão, a fim de observar a capacidade de
fertilização de espermatozóides tratados com pressão, bem como para in-
vestigar quaisquer malformações na prole.

Ejaculações de dois javalis foram prorrogadas de 1:3 diluente
comercial, na temperatura de corpo, então amostras foram deixadas se res-
15 friar para a temperatura ambiente em 30 minutos, antes do enchimento de
sémen prorrogado em bolsas de fusão. Bolsas de infusão foram colocados
para dentro da câmara de pressão de um dispositivo de pressurização au-
tomático (Crio-Innovation Ltd., Budapeste, Hungria) e programa de pressão
foi realizado a temperatura ambiente.

O tratamento com pressão usado era de 30 Mpa (300 bars) por
20 90 minutos. Depois do tratamento, amostras de sémen foram ulteriormente
prorrogadas com o mesmo diluente comercial a temperatura ambiente, então
5 porcas foram inseminadas no período de 1 hora depois da pressurização.
A inseminação foi repetida 12 horas depois da primeira inseminação com o
25 sémen tratado, foi deixado a 5°C pelo tempo correspondente.

No exame de ultrassom a totalidade dos cinco porcas foram pro-
vadas estarem grávidas. Após o fornecimento normal, 58 leitões saudáveis
nasceram. Os leitões estavam livres de quaisquer defeitos e malformações.

Foi concluído que o tratamento com pressão aplicado mantém a
30 capacidade de fertilização de espermatozóides de javali, e não causa qual-
quer efeito de malformação na prole. A ninhada menor média na fazenda era
de 9,8 leitões/porca, enquanto que com o tratamento de pressão aplicado

resultaria em 100% de taxa de gravidez e 11,6 de número de ninhada médio. Foi também incluído, portanto, que o tratamento de pressão aplicada aumenta também o número de ninhada médio.

Exemplo 5. Sobrevivência (clivagem após ativação *in vitro*) de ovócitos de porco depois dos tratamentos com pressão diferentes

Ovócitos de porco maduros *in vitro* foram ativados via eletroativação *in vitro* após as combinações de tratamento com pressão diferentes, a fim de determinar a tolerância a pressão dos ovócitos.

Seiscentos ovócitos desnudados, maduros *in vitro* foram divididos em grupos de tratamento (n = 15-20 ovócitos/grupo) e grupos de controle. Grupos são pressurizados em canudos artificiais de 0,5 ml em meio de TCM-HEPES (canudos foram selados com óleo mineral e bola de metal) com 20-40 Mpa (200-400 bars) por 30 – 90 min a 24°C e a 38,5°C. Controles foram mantidos nas mesmas circunstâncias, e um grupo de controle foi deixado no meio de IVM no termostato pelo tempo correspondente.

Depois dos tratamentos, ovócitos foram ativados *in vitro*, e foram colocados para dentro de um meio de cultura para dentro de um termostato a 38,5°C para outro desenvolvimento. Clivagem foi checada 48 horas depois da ativação

P/t (24 °C)	30 min	60 min	90 min
20 Mpa (200 bars)	71%	65%	68%
40 Mpa (400 bars)	85%	86%	74%
grupo de controle I.:	65%		
P/t (38.5 °C)	30 min	60 min	90 min
200 bar	91%	94%	76%
400 bar	72%	75%	83%
grupo de controle II.:	90%		
grupo de controle III.: (termostato)	81%		

Foi calculado que tratamentos com 20-40 Mpa (200 - 400 bars) por 30 - 90 minutos não eram nocivos para os ovócitos de porco maduros. Também, o tratamento de 40 Mpa (400 bars) por 30-60 minutos a 24°C, e o tratamento de 20 Mpa (200 bars) por 30-60 minutos a 38,5°C forneceu taxas de clivagem mais altas, do que os grupos de controle correspondentes. Tratamentos foram também feitos com 60-80 Mpa (600 - 800 bars)/30 - 90 mi-

nutos. Nesses grupos nenhum ovócito sobreviveu aos tratamentos; esses parâmetros de pressão eram nocivos.

Exemplo 6. Ovócitos de porco maduros *in vitro* depois de combinações de tratamento com pressão diferentes, ativados com um pulso elétrico 10 vezes mais forte do que o ótimo.

Ovócitos de porco maduros *in vitro* foram ativados via eletroativação de magnitude de 10 x *in vitro*, após combinações de tratamento com pressão diferentes, a fim de examinar, se ovócitos tratados melhor sobrevivem ao eletrochoque nocivo.

Trezentos - seiscentos ovócitos maduros *in vitro* (diariamente) foram divididos em grupos de tratamento (n = 15-20 ovócitos/grupo) e grupos de controle. Grupos com células cumulus foram pressurizadas em canudos artificiais de 0,5 ml em meio de TCM-HEPES (canudos foram selados com óleo mineral e bola de metal) com 20-80 Mpa (200-800 bars) por 30 - 120 minutos a 24°C. Controles foram mantidos nas mesmas circunstâncias, e um grupo de controle foi deixado no meio de IVM no termostato para o tempo correspondente. Depois dos tratamentos, ovócitos foram desnudados com turbilhamento, então, foram ativados *in vitro* com um impulso elétrico 10 vezes mais forte do que o impulso ótimo, e, então, foram colocados para dentro de um meio de cultura para dentro de um termostato de 38,5°C para outro desenvolvimento. Clivagem foi checada 48 horas depois da ativação, formação de blastócito foi examinada no sexto dia. Experiências foram repetidas três vezes.

Tabela 4. Percentagem dos ovócitos nos grupos diferentes, que clivaram e desenvolveram ulteriormente depois de ativação *in vitro* com pulso elétrico de 10x.

P/t	30 min	60 min	120 min
20 Mpa (200 bars)	42%	54%	26%
40 Mpa (400 bars)	35%	35%	29%
60 Mpa (600 bars)	0%	0%	0%
80 Mpa (800 bars)	0%	0%	
grupo de controle I. 24°C:	20%		
grupo de controle II.: (termostato)	10%		

Formação de blastócito			
P/t	30 min	60 min	120 min
20 Mpa (200 bars)	47%	44%	32%
40 Mpa (400 bars)	29%	35%	28%
60 Mpa (600 bars)	0%	0%	0%
80 Mpa (800 bars)	0%	0%	
Control I. (24 °C):	28%		
grupo de controle II.: (termostato)	21%		

Tratamento de 20-40 Mpa (200 - 400 bars) por 30-60 minutos forneceram número significativamente superior de ovócitos sobreviventes do que aqueles sem tratamento ou aqueles tratados com 60 ou 40 Mpa (600 ou 800 bars). Foi concluído que os tratamentos com pressão de 20 Mpa (200 bars) por 30 ou 60 minutos provaram prover taxa de clivagem significativamente superior ou taxa de blastócito em comparação com os grupos de controle ou outros grupos.

Exemplo 7. Sobrevivência de bactérias depois das combinações de tratamento de pressão diferentes após secagem por congelamento

Para a experiência dois micróbios, *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum* foram usados. Contagens de célula foram determinadas no meio nutritivo de TGE (Trypton Glucose Extract) (MERCK) e ágar de MRS (MERCK), respectivamente. Contagens de célula foram determinadas antes da preparação dos grupos de tratamento, depois do tratamento de pressão, e depois de 96 horas de incubação de 37°C após secagem por congelamento (c.f.u.). Tratamentos com pressão foram executados com 9 máquinas de pressurização na mesma hora de acordo com a seguinte tabela:

Pressão/tempo	30 min	60 min	90 min
20 Mpa (200 bars)	grupo de tratamento 1	grupo de tratamento 2	grupo de tratamento 3
40 Mpa (400 Mpa)	grupo de tratamento 4	grupo de tratamento 5	grupo de tratamento 6
60 Mpa (600 bars)	grupo de tratamento 7	grupo de tratamento 8	grupo de tratamento 9

Amostras foram introduzidos em canudos artificiais estéreis de 0,5 ml, e foram selados com bola de ferro estéril. Secagem por congelamento foi feita por equipamento de secagem por congelamento Edwards. Experiências foram replicadas duas vezes. Resultados são apresentados nas se-

guintes tabelas.

Tabela 5.: Número de células de *Lactobacillus plantarum* vivas (c.f.u./0,4 ml) antes e depois secagem por congelamento (duas repetições). (Contagem de célula inicial (c.f.u./ml) antes do tratamento: $9,0 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$)

Grupo de tratamento no.	Número de células vivas \ 0,4 ml		
	Antes da secagem por congelamento	Depois da secagem por congelamento I.	Depois da secagem por congelamento II.
1	$1,30 \times 10^7$	$2,29 \times 10^6$	$2,56 \times 10^6$
2	$7,80 \times 10^6$	$3,02 \times 10^6$	$2,54 \times 10^6$
3	$8,80 \times 10^6$	$2,01 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$
4	$5,70 \times 10^6$	$4,25 \times 10^6$	$4,19 \times 10^6$
5	$6,38 \times 10^6$	$1,99 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$
6	$1,26 \times 10^7$	$4,34 \times 10^6$	$4,13 \times 10^6$
7	$7,50 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,59 \times 10^6$
8	$8,70 \times 10^6$	$2,71 \times 10^6$	$3,88 \times 10^6$
9	$8,30 \times 10^6$	$3,36 \times 10^6$	$4,83 \times 10^6$
Controle	$1,05 \times 10^7$	$2,56 \times 10^6$	$4,08 \times 10^6$

- 5 **Tabela 6.:** Número de células de *Escherichia coli* vivas (c.f.u./0,4 ml) antes e depois da secagem por congelamento (duas repetições). (Contagem de célula inicial (c.f.u./ml) antes do tratamento: $4,08 \times 10^8$ - $4,10 \times 10^8$)

Grupo de tratamento no.	Número de células vivas \ 0.4 ml		
	Antes da secagem por congelamento	Depois da secagem por congelamento I.	Depois da secagem por congelamento II.
1	$6,10 \times 10^8$	$1,55 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$
2	$3,20 \times 10^8$	$2,56 \times 10^8$	$2,90 \times 10^8$
3	$4,80 \times 10^8$	$9,30 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$
4	$3,90 \times 10^8$	$1,36 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$
5	$5,90 \times 10^8$	$2,14 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$
6	$5,95 \times 10^8$	$2,27 \times 10^8$	$1,70 \times 10^8$

Grupo de tratamento no.	Número de células vivas \ 0.4 ml		
	Antes da secagem por congelamento	Depois da secagem por congelamento I.	Depois da secagem por congelamento II.
7	$6,10 \times 10^8$	$7,50 \times 10^7$	$9,50 \times 10^7$
8	$6,60 \times 10^8$	$1,65 \times 10^8$	$7,80 \times 10^7$
9	$6,20 \times 10^8$	$1,52 \times 10^7$	$1,21 \times 10^7$
Controle	$5,10 \times 10^8$	$2,50 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$

Grupos de tratamento marcados com números em negrito representam taxa de sobrevivência de célula significativamente mais alta em comparação com o grupo de controle. Entre os grupos de tratamento, grupos No. 2 e No. 4 provaram ser superiores. Foi concluído que um tratamento de alta pressão hidrostática específico antes da secagem por congelamento aumenta significativamente a taxa de sobrevivência de célula depois da secagem por congelamento.

Exemplo 8. Sobrevivência de embriões bovinos depois da biopsia de embrião ou sexo com/sem tratamento com pressão

10 Coleta de ovócito e Maturação *In vitro* (IVM)

COCs (aspirados de ovários oriundos de matadouros) são maturados em TCM-199 Earl's suplementados com FCS, LH (Sigma), FSH (Sigma), L-Glutamina, penicilina e estreptomicina, são cobertos com óleo mineral, em 38°C com 5,1% de CO₂ e umidade máxima em ar por 22 horas.

15 Preparação de esperma, Fertilização *In vitro* (IVF) e Cultura *In vitro* Culture (IVC)

Meio de fertilização era: TALP suplementado com BSA, penicilamin (Sigma), hipotaurina (Sigma), epinefrina (Sigma) e heparina (Sigma) cobertos com óleo mineral.

20 Espermatozóides móveis foram obtidos por centrifugação de espermatozóides congelados-descongelados (Gentec, Cuiaba, Brasil) em um gradiente de densidade descontínuo Percoll (2 ml de Percoll a 45% sobre 2 ml de Percoll a 90%) por 20 min a 700 g a temperatura ambiente. Depois da ressuspensão espermatozóides são adicionados às gotas de fertili-

zação. Placas foram incubadas por 19 h em 5% de CO₂ em ar umidificado a 39°C. Zigotos presumíveis foram, então, cultivados *in vitro* em gotículas de SOF sob óleo mineral em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 39°C.

Pressurização

- 5 Blastócitos expandidos foram carregados em canudos de plástico de 0,25 ml sem bolhas de ar (7-9 embriões/canudo), com meio de manutenção de embrião, então canudos foram selados com PVC. Canudos foram colocados no dispositivo de pressurização (Crio-Innovation Ltd., Szeged, Hungary). Embriões foram expostos a diferentes pressões hidrostática de 60
10 a 90 Mpa (por aumentos de 10 Mpa) por várias vezes (15, 30, 45, 50, 60, 90, 100 minutos), a temperatura ambiente.

Resultados

- 15 A taxa de sobrevivência dos embriões sexuais ou embriões depois da biopsia é significativamente mais alta com tratamento com pressão especialmente selecionado do que sem.

Exemplo 9. Sobrevivência de embriões bovinos depois da transferência de gene com/sem tratamento com pressão

- 20 Na presente experiência embriões bovinos são expostos a pressão hidrostática a fim de verificar se seu comportamento sob condições de pressão alterada é similar àquele dos embriões de camundongo. Depois do desafio com pressão hidrostática, amostras são submetidas a transferência de gene. Depois da cultura *in vitro* e transferência, a sobrevivência das amostras é aumentada em comparação com as amostras que não foram tratadas com pressão anteriormente.

- 25 Exemplo 10. Sobrevivência de embriões humanos depois do ICSI e biopsia de embrião com/sem tratamento com pressão

- 30 Na presente experiência embriões bovinos são expostos a pressão hidrostática a fim de verificar se seu comportamento sob condições de pressão alterada é similar àquele dos embriões de camundongo. Depois do desafio com pressão hidrostática, amostras são submetidas a ICSI ou biopsia. Depois da cultura *in vitro* e transferência, a sobrevivência das amostras é aumentada em comparação com as amostras que não foram tratadas com

pressão anteriormente.

Exemplo 11. Sobrevivência de ovócitos (humano, bovino, caprino, suíno) depois da tratamento com pressão, maturação e armazenagem *in vitro*

O objetivo da presente experiência é prover que ovócitos toleram qualquer processo (incluindo armazenagem/maturação *in vitro*) com eficácia muito maior se eles forem tratados anteriormente com pressão hidrostática. Ovócitos são tratados com pressão hidrostática e amostras são mantidas *in vitro* depois da liberação da pressão. A sobrevivência *in vitro* e *in vivo* dos ovócitos é aumentada em comparação com as amostras que não foram tratadas com pressão anteriormente.

Exemplo 12. Sobrevivência de células-tronco embriônicas depois da tratamento com pressão, armazenagem *in vitro*

O objetivo da presente experiência é prover que a sobrevivência de células-tronco embriônicas é aumentada por um tratamento anterior com pressão. Células-tronco embriônicas de camundongo são tratadas com pressão hidrostática e amostras são armazenadas e tratadas depois da liberação da pressão. Depois da sobrevivência *in vitro* e *in vivo* das células é aumentada em comparação com as amostras que não foram tratadas com pressão anteriormente.

Os resultados apresentados nos presentes exemplos mostram que o tratamento com pressão aplicado antes de qualquer tipo de técnica reprodutiva ou biotecnológica assistida aperfeiçoa a sobrevivência (tolerância a tensão) dos gametas e embriões (e células-tronco). Também, os dados apresentados nos embriões de camundongo, espermatozóides de javali e de touro indicam ampla aplicabilidade do conceito inventivo. A aplicação do método de acordo com a presente invenção pode ser útil no aperfeiçoamento de taxas de sucesso em toda a espécie de técnica reprodutiva ou biotecnológica assistidas, manipulação de embrião, incluindo outras espécies de mamífero, seres humanos não excluídos. O presente método também abre amplas possibilidade para outros campos onde manipulação de gametas e embriões podem encontrar suas aplicações.

Uma vez que congelamento de sémen fornece sobrevivência de

espermatóides pós-congelamento pobre nos javalis (e também cavalos), a ferramenta mais comum de reprodução dessas espécies é a inseminação de sémen fresco, prorrogado, prorrogado e resfriado ou prorrogado e esfriado. Pelo uso de sémen pré-tratado com HHP é significativamente melhor preservado na dada temperatura, e também, o tempo de armazenagem com qualidade superior é consideravelmente aumentado.

5 Similarmente, produção de embrião *in vitro* e *in vivo*, cultura *in vitro* de embriões, sexo, divisão e uso de qualquer procedimento biotécnico/biotecnológico, transferência de embrião, maturação de ovócito, ICSI ou
 10 qualquer procedimento biotécnico/biotecnológico no ovócito ou esperma grandemente reduzem sua capacidade de viabilidade/sobrevivência. Como uma extrapolação das características acima, pelo uso de gametas de pré-tratamento com HHP e embriões entrarão em qualquer tipo de tecnologia reprodutiva assistida (ART) ou procedimento biotécnico/biotecnológico com
 15 uma capacidade de sobrevivência aumentada.

Referências

- Abe, F., and Horikoshi, K. (1995). Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 130, 307-312.
- 20 Abe, F., and Horikoshi, K. (1997). Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H⁺-ATPase. *Extremophiles* 1, 89-93.
- Abe, F., and Horikoshi, K. (1998). Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in
 25 baro- (piezo-) physiology. *Extremophiles* 2, 223-228.
- Abe, F., Kato, C., and Horikoshi, K. (1999). Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol* 7, 447-453.
- Aldridge, B.E., Bruner, L.J. (1985). Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 817, 343-354.
- 30 Almlid T., and Johnson L.A., 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66:2899-2905.

- Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, Kirk RW. (1970) Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res* 1970;31:1807-1813.
- 5 Goodman MF, Cain Jt.(1993) Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *J Reprod Fertil* 1993;47:554. abstr.
- Graumann, P.L., Marahiel M.A. (1999). Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 171, 135-138.
- 10 Gross M., and Jaenicke R., 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 221:617–630.
- Hackett, A J; Wolynetz, M S (1982): Reproductive performance of totally confined sheep bred with semen extended in a lactose-egg yolk-glycerol buffer and stored at 5 degrees C *Canadian Journal Of Comparative Medicine. Revue Canadienne De Medecine Comparee*, Volume 46, Issue 3, July 1982, Pages 327-333
- 15 Hancock J.L., and Hovell G.L.R., 1959. The collection of boar semen. *Vet. Res.* 71:664-669.
- Harrop AE. (1954) Artificial insemination of a bitch with preserved semen *Br Vet J.* 1954; 110:424-425.
- 20 Jaenicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* 202, 715-728.
- Johnson F.H., Eyring H., Polissar M.J., 1954. *The Cinetic Basis of Molecular Biology.* Wiley, New York.
- 25 Kaarniranta K., Elo M., Sironen R., Lammi M.J., Goldring M.B., Eriksson J.E., Sistonen L., and Helminen H.J., 1998. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2319–2324.
- 30 Katila T, Combes GB, Varner DD, Blanchard TL (1997) Comparison of three containers used for the transPOrt of cooled stallion semen. *Theriogenology* 1997;48: 1085-I 092.

- LaTena A., Brandi A., Falconi M., Spurio R., Pon C.L., and Gualerzi C.O., 1991. Identification of a cold-shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* major cold shock gene encoding nucleotide protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10907–10911.
- 5 Ijaz A, Ducharme R.(1995) Effect of various extenders and taunne on survival of stallion sperm cooled to 5° C *Theriogenology* 1995, 44: 1039-1050.
- Macdonald, A.G. (1987). The role of membrane fluidity in complex processes under high pressure. In: Jonnasch, H.W., Marquis, R.E., Zimmerman, A.M., editors. *Current Perspectives in High Pressure Biology*. London: Academic
- 10 Press pp. 207-223.
- Maxwell W.M.C., and Johnson L.A., 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
- Murakami, T.H., Zimmerman, A.M. (1973). DNA synthesiseis in *Tetrahymena*: a pressure study. *Cytobios* 7, 171-181.
- 15 O'SHEA, T; WALES, R G (1964): EFFECTS OF POTASSIUM ON RAM SPERMATOZOA DURING CHILLING TO AND STORAGE AT 5 DEGREES C. *Journal Of Reproduction And Fertility*, Volume 53, August 1964, Pages 121-132.
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V., Welte-Chanes, J., and Swanson, B.G. (1997). Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 30, 703-708.
- 20 Péqueux, A., and Gilles, R. (1978). Effects of high hydrostatic pressures on the activity of the membrane ATPases of some organs implicated in hydro-mineral regulation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 59, 207-212.
- Phadtare, S., Alasina, J., Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-
- 25 shock proteins. *Curr Opin Microbiol* 2, 175-180.
- Pinto, C R; Paccamonti, D L; Eilts, B E (1999) Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, Volume 52, Issue 4, September 1999, Pages 609-616;
- Pribenszky C., Molnár M., Cseh S., Solti L., 2005a. Improving post-thaw
- 30 survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim. Reprod. Sci.* 87. 143-150.
- Pribenszky C., Molnar M., Solti L., Dengg J., Lederer J., 2005b. The effect of

- high hydrostatic pressure on the motility of fresh and frozen-thawed bull semen (pilot study). *Reproduction in domestic animals* 40, 338.
- Pribenszky Cs., Molnár M., Cseh S., and Solti L., 2003. Viability of embryos after exposing to high hydrostatic pressure. *Theriogenology* 59, 329 (Abstract).
- 5 Pribenszky Cs., Molnár M., Cseh S., and Solti L., 2004. Survival of mouse blastocysts after low temperature preservation under high pressure. *Acta Vet. Hung.* 52, 479–487.
- Routray R., Suzuki T., Strussmann C.A., Takai R., 2002. Factors effecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*.
- 10 *Theriogenology* 58:1483–1496.
- Schmid, G., Lüdemann, H. D., and Jaenicke, R. (1975) High pressure effects on the activity of glycolytic enzymes. *Biophys Chem* 3, 90-98.
- Schuster, B., Sleytr, U.B. (2002). The effect of hydrostatic pressure on S-layer-supported lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1563, 29-34.
- 15 Silva, J.L., Foguel, D., Royer, C.A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci* 26, 612-618.
- Weber, G., Drickamer, H.G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q Rev Biophys* 16, 89-112.
- Welch, T.J., Farewell, A., Neidhardt, F.C., Bartlett, D.H. (1993). Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J Bacteriol* 175, 7170-7177.
- 20 Wemekamp-Kamphuis, H.H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A., Abee, T. (2002). Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 68, 456-63.
- 25 Wouters, J.A., Jeynov, B., Rombouts, F.M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T. (1999). Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology* 145, 3185-3194.
- Yager, P., Chang, E.L. (1983). Destabilization of a lipid non-bilayer phase by high pressure. *Biochim Biophys Acta* 731, 491-494.
- 30 Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol* 27, 247-255.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o aperfeiçoamento da viabilidade de material biológico viável e uso do dito material compreendendo
 - (a) aplicação de pressão hidrostática ao dito material biológico;
 - 5 (b) manutenção do dito material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado;
 - (c) liberação da pressão hidrostática;
 - (d) uso do dito material para qualquer finalidade desejada de acordo com qualquer protocolo útil, com a condição de que o dito uso não
 - 10 compreende criopreservação e a dita aplicação da dita pressão hidrostática não resulta em alotriploidização do dito material biológico.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a dita pressão hidroestática está na faixa de 1 a 200 MPa, de preferência de 10 a 100 MPa, mais de preferência de 20 a 75 MPa, e ainda mais preferência de 30 a
- 15 60 MPa.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a dita pressão hidrostática é aplicada por um período de tempo entre 0,001 segundos e 600 minutos, de preferência de 1 segundos a 300 minutos, mais de preferência de 10 segundos a 150 minutos, com preferência de 20 segundos
- 20 a 90 minutos, e ainda mais preferência de 30 segundos a 60 minutos.
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a dita pressão é liberada gradualmente durante um período de tempo entre liberação instantânea e 6 horas.
5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
- 25 4, em que a dita pressão é aplicada, mantida e liberada de acordo com um perfil de pressão predeterminado.
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a dita pressão é aplicada, mantida e liberada de acordo com um perfil de temperatura predeterminado.
- 30 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito material biológico é um gameta ou embrião, e é de preferência selecionado do grupo que consiste em oócitos, espermatozoides, zigotos, mórulas,

blastócitos, embriões e células tronco de um animal vertebrado.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o dito animal vertebrado é um peixe, pássaro, ou um mamífero, de preferência bovino, eqüino, caprino, ovino, suíno, outros animais de criação, animais de estimação, primatas, incluindo ser humano.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito material biológico é uma cultura de microorganismos.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a dita cultura de microorganismo é uma cultura bacteriana.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o dito uso do dito material biológico incorpora quaisquer técnicas ou protocolos que são aplicáveis no campo das técnicas reprodutivas assistidas, manipulações biotécnicas e/ou biotecnológicas.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o dito uso é secagem por congelamento.

BR 02/87928-4

RESUMO

Patente de Invenção: **"AUMENTO DA VIABILIDADE E TOLERÂNCIA À TENSÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO VIÁVEL"**.

A presente invenção refere-se a um método para o aperfeiçoamento da tolerância à tensão e/ou viabilidade de material biológico viável e manipulação do dito material compreendendo aplicação de pressão hidrostática ao dito material biológico; manutenção do dito material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado; liberação da pressão hidrostática; e manipulação do dito material para qualquer fim desejado de acordo com qualquer protocolo útil. A manipulação do dito material biológico incorpora quaisquer técnicas, protocolos que são aplicáveis no campo de técnicas reprodutivas assistidas, manipulações biotécnicas e/ou biotecnológicas.