

(11) Número de Publicação: **PT 1470407 E**

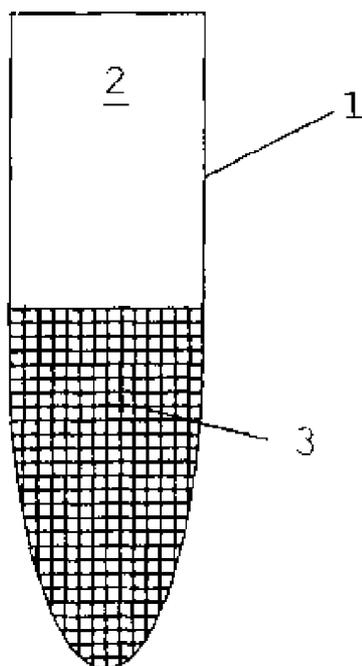
(51) Classificação Internacional:
G01N 1/42 (2007.10) **A01N 1/02** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.01.29	(73) Titular(es): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. HANSASTRASSE 27C 80686 MUNCHEN	DE
(30) Prioridade(s): 2002.01.30 DE 10203630		
(43) Data de publicação do pedido: 2004.10.27		
(45) Data e BPI da concessão: 2008.07.16 211/2008	(72) Inventor(es): ULRICH ZIMMERMANN HEIKO ZIMMERMANN	DE DE
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A CRIOCONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

(57) Resumo:

RESUMO**"Processo para a crioconservação de amostras biológicas"**

São descritos porta-amostras e processos para a crioconservação, especialmente de materiais biológicos, com, pelo menos, um reservatório de amostras (2) destinado à recepção de uma amostra biológica, sendo que no reservatório de amostras (2) se encontra disposto um corpo de suporte (3) num material com uma estrutura de volume que apresenta uma multiplicidade de espaços ociosos internos abertos, susceptíveis de serem cheios com a amostra. É também descrita a utilização de estruturas de catalisador para automóveis ou de cerâmicas biomórficas para a fabricação de corpos de suporte destinados à recepção de amostras para crioconservação.

DESCRIÇÃO

"Processo para a criopreservação de amostras biológicas"

O invento refere-se a processos para a criopreservação de amostras biológicas.

Na biomedicina e na biotecnologia modernas existe uma necessidade sempre crescente de materiais biológicos criopreservados, especialmente células, grupos de células, tecidos naturais ou artificiais, órgãos inteiros e células de organismos embrionários. Por "criopreservação" entende-se o arrefecimento dos materiais biológicos a baixas temperaturas, chamadas criogénicas, especialmente na ordem dos -80°C até aos -196°C . Sob estas condições, o metabolismo de células vivas praticamente pára, podendo as células, desta maneira, ser armazenadas durante vários anos.

Para conservar a vitalidade de células criopreservadas, são utilizados meios criogénicos específicos que compreendem substâncias protectoras (crioprotectores), como p.exp. sulfoxido de dimetilo (DMSO), etilenoglicol, glicerol e açúcares, como p.exp. trealose ou glucose. Os crioprotectores protegem as células através da estabilização das membranas celulares e macromoléculas e através da inibição da formação de gelo intracelular. Os cristais de gelo intracelulares são os principais responsáveis por uma danificação mecânica irreversível das membranas celulares (veja-se S.S.N. Murthy em "Cryobiology" vol. 36, 1998, pág. 84-96). A composição do meio criogénico é optimizada experimentalmente em relação ao respectivo tipo de célula ou de tecido.

Além da composição do meio criogénico, o protocolo experimental de congelação e descongelação (velocidade, gradiente de temperatura, duração, etc.) desempenha um papel decisivo para a preservação de elevadas vitalidades celulares. Neste âmbito têm sido publicados, até à data, numerosos protocolos para diferentes tipos de amostra e condições de conservação, os quais não só descrevem velocidades de arrefecimento e descongelação rápidas como também lentas, ou uma combinação de ambas (veja-se p.exp. J.M. Baust et al. em "Cell Transplantation" vol. 10, 2001, pág. 561-571, e M.

Miyamoto *et al.* em "Cell Transplantation" vol. 10, 2001, pág. 363-371). Verificou-se que em todo o caso é necessária uma regulação exacta da temperatura, uma vez que a vitalidade celular depende muitíssimo da velocidade de arrefecimento/descongelação.

Ao congelar suspensões celulares ou tecido em criorecipientes convencionais feitos de plástico, não fica garantido um cumprimento exacto da mesma velocidade de arrefecimento de todas as células da amostra. Para esta situação contribuem, por um lado, a razão desfavorável entre superfície e volume (recipiente criogénico/amostra celular) e, por outro lado, as reduzidas condutividades térmicas do plástico habitualmente utilizado para os recipientes criogénicos assim como do meio criogénico aquoso.

Isto não apenas provoca um gradiente vertical da temperatura dentro da amostra congelada, como também uma forte heterogeneidade espacial da taxa de arrefecimento. Conforme a sua posição na amostra, as células individuais são sujeitas a diferentes condições de temperatura, taxas de arrefecimento e de descongelação. Esta forte heterogeneidade das velocidades de arrefecimento para as células individuais provoca, por isso, fortes perdas de vitalidade, uma vez que só o cumprimento da óptima velocidade de arrefecimento para todas as células resulta numa elevada vitalidade da amostra.

Para diminuir e eliminar estes problemas conhecem-se as seguintes abordagens de uma resolução. Ao congelar espermatozóides de porco em recipientes de plástico chatos (chamados *flat-packs*), B.M. Eriksson *et al.* (veja-se "Anim. Reprod. Sci." vol. 63, 2000, pág. 205-220) conseguiram provar um aumento significativo da mobilidade dos espermatozóides, em comparação com a sua congelação em tubos de plástico cilíndricos (chamados *maxi-straws*). Os autores justificam este resultado por o processo de congelação e descongelação ser mais uniforme nos recipientes criogénicos chatos. Problemática é também uma velocidade de descongelação fortemente diminuída no núcleo das amostras, nos "maxi-straws", devido às propriedades isoladoras da água já descongelada na periferia das amostras.

S.-P. Park *et al.* (veja-se "Human Reproduction" vol. 15, 2000, pág. 1787-1790) descrevem a congelação ultra-rápida de embriões humanos em cima de grades de cobre, concebidos originalmente para a microscopia electrónica. Neste processo ocorre uma rapidíssima dissipação de calor ao se introduzirem as amostras em azoto líquido o que, por sua vez, é favorável para a vitalidade dos embriões.

Da prática conhece-se um sistema disponível comercialmente para o armazenamento de microrganismos (produto "Micrybank", fabricante: SensLab-GmbH, Leipzig, Alemanha). Os microrganismos são ligados à superfície porosa de pequenas esferas cerâmicas, que são conservadas num meio criogénico especial. No entanto, este sistema serve apenas para melhorar o manuseamento das amostras. O processo de congelação não é optimizado. As esferas cerâmicas possuem uma condutividade térmica mais baixa, sendo desta maneira dificultada uma congelação ou descongelação rápida. Além disso, e devido às suas dimensões, células ou tecido não são adequados para uma adsorção às superfícies porosas.

Também se sabe como congelar amostras biológicas sob a forma de volumes de amostra pequeníssimos (na ordem dos ml ou μ l) em crio-substratos estruturados bidimensionais, sendo desta maneira evitados os problemas mencionados dos gradientes de temperatura e de velocidade de arrefecimento. Com esta técnica é apenas possível armazenar reduzidas quantidades de amostra num crio-substrato, o que pode ser desvantajoso em aplicações que requerem grandes volumes de amostra (p.exp. na ordem dos ml).

Em WO 00/24437 é revelada a utilização de borracha de silicone porosa como material de suporte, especialmente para a crioconservação de materiais biológicos. A utilização de um material cerâmico poroso para a realização de uma condução de transporte de líquidos de refrigeração está descrita em US 5 587 228. Outras aplicações de materiais porosos para a recepção de meios de refrigeração estão descritas em US 2001/0030040, JP 2001033053 e JP 11093643.

O problema a resolver pelo invento é o de disponibilizar processos aperfeiçoados para a crioconservação de amostras

biológicas por meio dos quais são evitados os inconvenientes dos porta-amostras convencionais. Com a utilização dos porta-amostras de acordo com o invento pretende-se em especial, tornar possível o ajuste reprodutível de protocolos experimentais de congelação e descongelação definidos, pretendendo-se evitar gradientes de temperatura ou variações da velocidade de arrefecimento ou de descongelação dentro de uma amostra. Além disso pretende-se que o porta-amostras utilizado no processo seja adequado para a conservação de grandes volumes de amostra. Um problema a resolver pelo invento é também o de disponibilizar processos aperfeiçoados para a crioconservação por meio dos quais sejam evitados os inconvenientes dos protocolos experimentais de congelação e descongelação convencionais.

Estes problemas são resolvidos através de um processo com as características de acordo com a reivindicação 1. Concretizações e aplicações vantajosas do invento resultam das reivindicações dependentes.

No processo de acordo com o invento utiliza-se, em especial, um porta-amostras para crioconservação, especialmente de amostras biológicas, com pelo menos um reservatório de amostras destinado à recepção de uma amostra biológica, dentro do qual se encontra disposto um corpo de suporte num material com uma estrutura que apresenta uma multiplicidade de espaços ociosos internos abertos, susceptíveis de serem cheios com a amostra. O corpo de suporte com os espaços ociosos internos possui uma superfície interna substancialmente superior à superfície interna do reservatório de amostras. O facto de, devido a esta medida, a razão entre superfície e volume ser substancialmente melhorada em comparação com os porta-amostras convencionais, constitui uma vantagem. Ligando o corpo de suporte termicamente a um meio de refrigeração, os processos de arrefecimento e de descongelação podem ser homogeneizados substancialmente no que se refere à distribuição da temperatura e à velocidade de alteração da temperatura.

O corpo de suporte consiste, pelo menos parcialmente, num material que possui uma condutividade térmica como um metal. Desta maneira, a temperatura real do meio de refrigeração pode

ser transmitida com maior velocidade para a amostra. O facto de os protocolos experimentais de arrefecimento e descongelação poderem ser realizados com maior precisão e reprodutibilidade é uma vantagem. O corpo de suporte consiste de preferência num metal, numa liga metálica ou num material compósito contendo um metal ou uma liga metálica. É também possível que o corpo de suporte consista num material polimérico ou cerâmico cuja superfície interna esteja revestida com um metal, uma liga metálica, um material semiconductor ou um composto químico que tenha uma condutividade térmica análoga à condutividade térmica dos metais. O polímero pode, por exemplo, ser formado por um plástico sintético ou um material sólido com base num material orgânico natural, especialmente com base em celulose, como p.exp. por madeira pirolisada.

A estrutura com os espaços ocios internos é formada de preferência por um corpo cujo volume está cheio de favos, poros, canais ou outras estruturas permeáveis. O tamanho mais pequeno do corte transversal dos espaços ocios encontra-se, de preferência, na ordem dos 1 μm a 10 mm, de preferência na ordem dos 5 μm a 5 mm. Os espaços ocios podem estar dispostos de forma regular (estrutura de favos) ou irregular (tecidos ou órgãos vegetais ou animais revestidos interiormente, estrutura de esponja ou espuma). O arranjo regular possui a vantagem de tornar possível indicar quantitativamente com mais precisão o volume de amostra recebido pelo corpo de suporte. A estrutura irregular é susceptível de poder ser produzida, em geral, com uma razão mais favorável entre superfície e volume, conforme o processo de produção do corpo de suporte.

De preferência, a forma exterior do corpo de suporte com a superfície interior está adaptada à forma interior do pelo menos um reservatório de amostras do porta-amostras. Esta característica tem a vantagem de um elevado aproveitamento do volume do reservatório de amostras e de uma homogeneização das condições de crioconservação em todo o reservatório de amostras. O corpo de suporte pode estar disposto de forma fixa ou amovível no reservatório de amostras. A colocação fixa tem a vantagem de o porta-amostras formar uma peça compacta autónoma, susceptível de ser manuseada sem problemas especialmente em sistemas automatizados. No caso do corpo de

suporte poder ser retirado do reservatório de amostras, resultam vantagens no que se refere à limpeza e/ou a um pré-tratamento do corpo de suporte (p.exp. refrigeração prévia).

Uma outra vantagem consiste no corpo de suporte poder ser utilizado como permutador de calor. Por exemplo, no caso do reservatório de amostras estar apenas parcialmente cheio, contendo desta maneira só uma parte da estrutura oca do corpo de suporte uma amostra, a restante estrutura saliente pode servir para a permuta de calor. É por exemplo possível que um meio de refrigeração em estado de vapor passe pelas partes livres do corpo de suporte, acelerando, assim, a dissipação de calor. Na descongelação, pelo contrário, é também possível uma aceleração da absorção de calor. De acordo com uma concretização conveniente, o corpo de suporte pode estar equipado adicionalmente com um elemento permutador de calor que se salienta do corpo de suporte, mergulhando no meio de refrigeração. Nesta concretização, a permuta de calor é melhorada mesmo no caso do corpo de suporte estar completamente cheio.

De acordo com uma variante do invento, o corpo de suporte é formado, especialmente, do material de suporte de um catalisador convencional, como o que se utiliza em automóveis para reduzir os agentes poluentes. Os corpos de suporte provenientes de estruturas de catalisador consistem, por exemplo, num material de base em aço ou cerâmica revestido com um metal precioso (p.exp. platina). A utilização de estruturas de catalisador tem a vantagem particular de os suportes de catalisador que se conhecem, já estarem otimizados em relação a uma grande superfície interna e consistirem em materiais inertes adequados para serem utilizados na crioconservação.

De acordo com uma outra variante do invento, o corpo de suporte consiste, especialmente, numa cerâmica denominada biomórfica, feita de um material à base de polissacárido. Este material pode ser produzido, com vantagem, a partir de plantas. Conforme as características de crescimento das plantas, podem ser ajustados espaços ociosos com os respectivos parâmetros dimensionais desejados. Uma outra vantagem das cerâmicas biomórficas consiste na sua biocompatibilidade.

Objecto do invento é o processo para a crioconservação, utilizando porta-amostras mencionado. Uma amostra biológica é aplicada por meio de técnicas em princípio disponíveis, como p.exp. pipetação ou transvasamento, no corpo de suporte, sendo absorvida por este. De acordo com uma concretização preferida do processo de acordo com o invento, utiliza-se um corpo de suporte pré-refrigerado, sendo desta maneira a amostra sujeita, com vantagem, a uma refrigeração prévia uniforme antes do processo de arrefecimento propriamente dito.

As amostras biológicas conservadas de acordo com o invento compreendem geralmente líquidos contendo um material biológico. O líquido compreende, por exemplo, um meio de cultura, uma solução de nutrientes ou um outro meio envolvente compatível. O invento pode ser utilizado com vantagem nos materiais biológicos de interesse, como p.exp. células, grupos de células, tecidos naturais ou artificiais, pedaços de tecido, órgãos, partes de órgãos ou células de organismos embrionários. A amostra está, por exemplo, presente sob a forma de uma amostra em suspensão ou na forma de um líquido que inclui o material biológico. A amostra pode, portanto, também compreender, p.exp., líquidos nos quais se encontram materiais biológicos no fundo de um recipiente. As dimensões dos materiais e dos espaços ociosos no porta-amostras são de um modo geral ajustadas umas às outras. Podem ser conservados com vantagem, especialmente, tecidos ou partes de tecido biológicos, previstos para a produção de tecido ("Tissue Engineering").

Outras vantagens e pormenores do invento são descritos a seguir, com referência aos desenhos anexos. Mostram:

Figuras 1 e 2: Visualizações esquemáticas de diferentes concretizações de porta-amostras utilizados de acordo com o invento, e

Figuras 3 e 4: Resultados experimentais obtidos com porta-amostras utilizados de acordo com o invento.

De acordo com a concretização ilustrada na fig. 1, um porta-amostras 1 utilizado de acordo com o invento compreende um reservatório de amostras 2, no qual se encontra disposto um corpo de suporte 3. O porta-amostras 1 possui, por exemplo, a

forma de um cilindro fechado em baixo. Pode ser formado, por exemplo, por um tubo de amostras ou um tubo de ensaio em princípio usuais. O corpo de suporte 3 possui uma estrutura de volume tendo uma elevada superfície interior. A forma exterior do corpo de suporte 3 está adaptada à forma interior do reservatório de amostras ou é ligeiramente maior (veja-se em baixo). O volume interior do reservatório de amostras 2, ocupado pelo corpo de suporte 3, encontra-se, por exemplo, na ordem dos 0,5 a 10 ml, de preferência 1 a 5 ml.

O corpo de suporte 3 consiste, por exemplo, num material metálico poroso, em forma de favos, de esponja ou de espuma, com elevada condutividade térmica, ou em tecidos ou órgãos vegetais ou animais revestidos interiormente. O corpo de suporte torna possível, de maneira vantajosa, uma absorção e uma dissipação de calor planeadas, rápidas e reguláveis. A condutividade térmica é, por exemplo, de pelo menos 0,1 J/K kg. A relação entre a superfície interior e o volume do corpo de suporte depende do tipo de material utilizado no corpo de suporte e/ou das condições da sua fabricação. Na aplicação num caso concreto, o material do corpo de suporte ou a relação mencionada entre superfície e volume são seleccionados em conformidade com as propriedades das amostras a conservar (p.exp. amostras de suspensão) e com a instalação criogénica disponível. A relação pode, por exemplo, ser de 4000 m⁻¹. Os espaços ociosos interiores do corpo de suporte são limitados por paredes cuja espessura é, de preferência, inferior a 0,2 - 0,5 mm.

O corpo de suporte 3 é, por exemplo, formado por material de um catalisador metálico para automóveis. O tamanho de poros ou o número de células por volume é escolhido em função da aplicação, conforme as amostras biológicas a conservar. O corpo de suporte 3 consiste, por exemplo, em platina (condutividade térmica: 0,032 J/K kg), aço (0,11 J/K kg) ou alumínio (0,22 J/K kg). O corpo de suporte 3 é, por exemplo, talhado de um catalisador metálico ou cerâmico-metálico para automóveis, do fabricante Fa. Matrix, Fürstenfeldbruck, Alemanha.

Uma vantagem das estruturas de catalisador convencionais consiste na sua reduzida expansão térmica. Nas diferentes

fases de um processo de conservação, o corpo de suporte mantém, no essencial, as suas dimensões exteriores.

Como alternativa, o corpo de suporte pode consistir num material compósito feito de um polímero ou de uma cerâmica com um revestimento interior num material de boa condutividade térmica. Além disso, o corpo de suporte pode ser feito de um material natural à base de polissacárido (p.exp. celulose, alginatos, pectinas), especialmente à base de madeira ou de fibras vegetais, tendo sido sujeito a uma pirólise e a um tratamento da superfície interior, p.exp. a uma silanização ou ao depósito de um metal (cerâmica denominada biomórfica). Como corpo de suporte é especialmente adequada madeira silanizada tendo uma estrutura porosa, como a descrita por P. Greil em "Journal of the European Ceramic Society" vol. 21, 2001, pág. 105-188. Outros exemplos de materiais biocompatíveis de origem vegetal ou animal, compreendem corpos de suporte à base de cactos, eufórbias, diatomáceas, arbustos de papiro, agaves, *alcea rosea*, sabugueiro, peles de animais estampadas, ossos, especialmente ossos longos, esponjas e favos de abelha. Alternativamente, o corpo de suporte pode ser feito de um mineral poroso natural, p.exp. argila expandida, com um revestimento interior.

Um corpo de suporte consistindo numa cerâmica biomórfica é fabricado de acordo com o processo seguinte. Em primeiro lugar é pirolisado um corpo de madeira, para ser formada uma estrutura adequada de feixes vasculares de carbono. A pirólise é realizada, por exemplo, a 1400°C. A seguir, a estrutura de feixes vasculares é imersa num banho de revestimento. O líquido do banho de revestimento humidifica a superfície interna da estrutura de feixes vasculares. O revestimento é, por exemplo, realizado numa massa fundida de silício a cerca de 1600°C. Durante o arrefecimento do corpo da estrutura retirado da massa fundida, deposita-se uma camada de silício na superfície interior. É útil que se possam produzir corpos de suporte com diferentes tamanhos de poros, conforme a escolha da madeira utilizada. Além disso existe uma grande variabilidade em relação às dimensões exteriores dos corpos de suporte. O bambu silanizado, por exemplo, proporciona corpos de suporte com diâmetros de cerca de 1 a 5 cm. Com *Rattan*

podem ser fabricados corpos de suporte com diâmetros até cerca de 1 cm.

Em alternativa à silanização pode realizar-se um revestimento da estrutura de feixes vasculares pirolisada (xilema) com metais biocompatíveis, não tóxicos. Como banho de revestimento pode ser utilizada, por exemplo, ouro ou platina fundidos.

De um modo geral, a superfície interna de um corpo de suporte pode ter um revestimento múltiplo. Nas cerâmicas biomórficas, por exemplo, pode ser formada uma camada múltipla de silício, ouro e outros materiais biocompatíveis. De um modo geral é possível utilizar para o revestimento de superfícies internas de corpos de suporte, técnicas conhecidas, p.exp., do revestimento das "bolachas" na tecnologia de semicondutores.

Uma outra vantagem de corpos de suporte consiste na sua deformabilidade mecânica. Embora os corpos de suporte consistam em princípio num material sólido, a sua forma externa é ligeiramente deformável elasticamente, devido à estrutura de volume fortemente permeável. O corpo de suporte pode ser produzido, primeiro, tendo uma forma exterior ligeiramente maior que a forma interior do reservatório de amostras. Na inserção do corpo de suporte no reservatório de amostras, o primeiro é comprimido, sendo desta maneira fixado no reservatório de amostras devido ao efeito da deformação elástica.

A fig. 2 ilustra um porta-amostras 1 com a forma de uma placa de cultura celular com vários reservatórios de amostras 21, 22, 23,..., em cada um dos quais está disposto um corpo de suporte 31, 32, 33,... Os reservatórios de amostras possuem, por exemplo, uma forma cilíndrica. Na parte superior da fig. 2 são ilustrados os corpos de suporte numa vista esquemática de topo. Os diferentes padrões das imagens parciais A, B e C ilustram as diferentes formas de espaços ociosos interiores com as quais um corpo de suporte utilizado de acordo com o invento pode estar equipado.

O corpo de suporte de acordo com a fig. 2A, por exemplo, consiste em chapas onduladas que, deslocadas umas em relação

às outras ou utilizando superfícies intermédias planas, são ligadas umas às outras de maneira a formar uma multiplicidade de canais rectos 41. Os canais 41 atravessam o corpo de suporte na direcção axial. De acordo com a fig. 2B, o corpo de suporte possui uma estrutura irregular em favos. A figura 2C mostra uma estrutura regular em favos, também com canais 43 que se estendem na direcção axial.

A figura 2A ilustra esquematicamente a altura de enchimento de uma amostra em suspensão 10. A parte do corpo de suporte 31 que se salienta para além da altura de enchimento, favorece a permuta de calor com o ambiente.

Para melhorar ainda mais a permuta de calor, também no caso do corpo de suporte estar completamente cheio, este pode ser equipado com, pelo menos, um elemento permutador de calor saliente 51. O elemento permutador de calor 51 consiste, por exemplo, no mesmo material que o corpo de suporte. Prevê-se, por exemplo, uma tira saliente para dentro do espaço ou que esteja disposta na superfície da parede do reservatório de amostras.

Os elementos permutadores de calor 52, 53 podem ser previstos na forma de ligações entre os corpos de suporte de reservatórios de amostras vizinhos, como ilustrado esquematicamente nas figuras 2B e 2C. Através dos elementos permutadores de calor 52, 53 é formado um conjunto de uma multiplicidade de corpos de suporte 32, 33, mediante o qual se pode equipar simultaneamente uma multiplicidade de reservatórios de amostras. No processo de acordo com o invento podem ser utilizados, por exemplo, corpos de suporte que, dispostos de acordo com o formato de uma placa de micro- ou nanotitulação e ligados uns aos outros através de elementos permutadores de calor, formam um conjunto de corpos de suporte.

Para a criopreservação, faz-se entrar em contacto um porta-amostras 1 de acordo com as fig. 1 ou 2, com um meio de refrigeração acoplado ao corpo de suporte numa permuta de calor directa ou indirecta, mediante o material da parede do reservatório de amostras e/ou através de elementos permutadores de calor.

Exemplo de concretização

Os resultados de ensaio ilustrados nas figuras 3 e 4 foram obtidos sob as seguintes condições experimentais. Foram criopreservadas células da linha celular Sp2 na fase exponencial de crescimento. Como meio criogénico foi utilizada uma mistura de 90% de FCS e 10% de DMSO ou uma solução contendo trealose. Como porta-amostras utilizou-se uma placa de cultura celular de acordo com a fig. 2 com seis reservatórios de amostras. Em cada reservatório de amostra foi utilizado um disco feito de um material de catalisador, com um volume de cerca de $0,5 * 2 * 2 \text{ cm}^3$. Os corpos de suporte foram esterilizados com etanol e fechados do seu lado inferior com uma camada de plástico.

Para obter uma amostra em suspensão são recolhidas, primeiro, células Sp2 em frascos de cultura e analisadas mediante uma medição CASY, em relação à distribuição dos tamanhos e ao número de células. Foi formada uma amostra em suspensão de $8,2 * 10^5$ células por ml. Antes da criopreservação, a amostra em suspensão foi centrifugada durante cerca de 10 minutos a 1000 rpm. As peletes celulares formadas foram ressuspensas, em cada caso em 1 ml de meio de refrigeração pré-refrigerado, e introduzidas no corpo de suporte por pipetagem.

Foram realizados diferentes protocolos experimentais de congelação e descongelação. Uma congelação rápida significa uma transferência imediata para uma arca de -80°C . Uma congelação lenta significa a realização de uma refrigeração prévia durante uma hora numa arca de -20°C , seguida por colocação numa arca de -80°C . Uma descongelação rápida significa uma transferência directa de uma arca a -80°C para a temperatura ambiente. Uma descongelação lenta compreende um primeiro aquecimento durante uma hora numa arca a -20°C , um armazenamento durante 30 minutos sobre gelo com adição por pipeta de 10 ml de CGM (37°C) e ressuspensão repetida das amostras.

Para verificar o resultado da criopreservação, as amostras descongeladas foram centrifugadas e ressuspensas em

CGM. A seguir a uma cultura de 24 h a 37°C e 5% CO₂, foi realizada uma medição CASY para determinar o número de células, a distribuição dos tamanhos e a vitalidade das células após a crioconservação.

As figuras 3 e 4 mostram os resultados de diferentes protocolos experimentais de congelação e descongelação com um porta-amostras utilizado de acordo com o invento, em comparação com uma amostra de controlo (crioconservação num tubo de ensaio). Da crioconservação com o porta-amostras utilizado de acordo com o invento resulta um aumento substancial da viabilidade e do número de células viáveis sob todas as condições de ensaio, especialmente no caso dos processos de congelação rápida.

Lisboa, 2008-10-16

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a crioconservação de materiais biológicos, compreendendo os passos seguintes:

- colocação de amostras biológicas num porta-amostras com, pelo menos, um reservatório de amostras (2, 21, 22, 23) destinado à recepção das amostras biológicas, sendo que no reservatório de amostras (2, 21, 22, 23) está disposto um corpo de suporte (3, 31, 32, 33) de um material com uma estrutura de volume que apresenta uma multiplicidade de espaços ociosos internos abertos (41, 43) nos quais são colocadas as amostras biológicas, e
- arrefecimento do porta-amostras,

caracterizado por

- o corpo de suporte (3, 31, 32, 33) ser feito do material de um catalisador para automóveis, de materiais biocompatíveis de origem vegetal ou animal, de um material natural à base de polissacárido ou de uma cerâmica biomórfica.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que se utiliza um corpo de suporte pré-refrigerado.

3. Processo de acordo com pelo menos uma das reivindicações anteriores, em que se utiliza um corpo de suporte que consiste num material compósito no qual os espaços ociosos internos estão, pelo menos parcialmente, revestidos com um material cuja condutividade térmica é análoga à condutividade térmica de metais.

4. Processo de acordo com uma das reivindicações anteriores, no qual se utiliza um corpo de suporte (3, 31, 32, 33) que possui favos, poros, canais ou espaços ociosos do tipo de uma esponja ou espuma.

5. Processo de acordo com uma das reivindicações anteriores, no qual se utiliza um corpo de suporte (3, 31, 32, 33) cuja forma está adaptada à forma interior do reservatório de amostras (2, 21, 22, 23), ou é ligeiramente maior.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, compreendendo o passo seguinte:

- fixação do corpo de suporte (3, 31, 32, 33) no reservatório de amostras (2, 21, 22, 23) sob o efeito de uma deformação elástica.

7. Processo de acordo com uma das reivindicações anteriores, no qual o corpo de suporte (3, 31, 32, 33) está equipado com, pelo menos, um elemento permutador de calor (51, 52, 53) e é utilizado como permutador de calor.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, no qual está prevista uma multiplicidade de reservatórios de amostras e no qual os respectivos corpos de suporte estão ligados uns aos outros através de elementos permutadores de calor (52, 53).

9. Utilização de estruturas de catalisadores para automóveis, de materiais biocompatíveis de origem vegetal ou animal, de um material natural à base de polissacárido ou de uma cerâmica biomórfica, para a formação de um corpo de suporte com uma estrutura de volume que apresenta uma multiplicidade de espaços ociosos internos abertos, para a crioconservação de amostras biológicas.

Lisboa, 2008-10-16

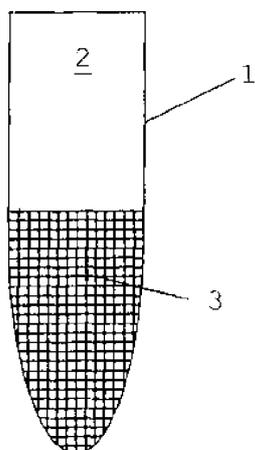


Figura 1

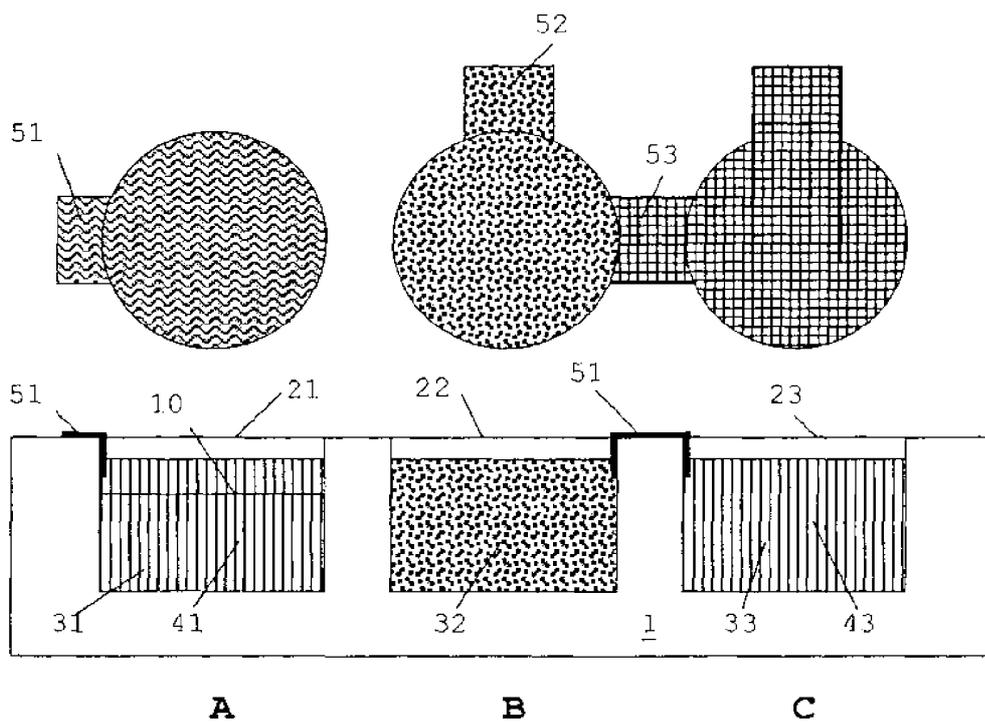


Figura 2

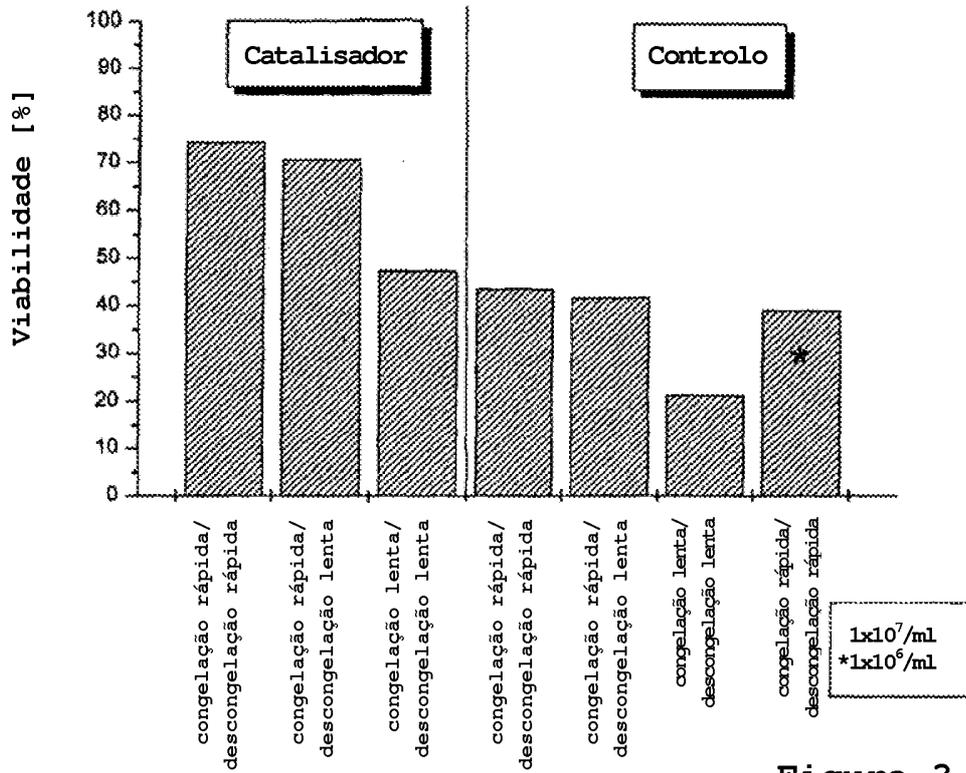


Figura 3

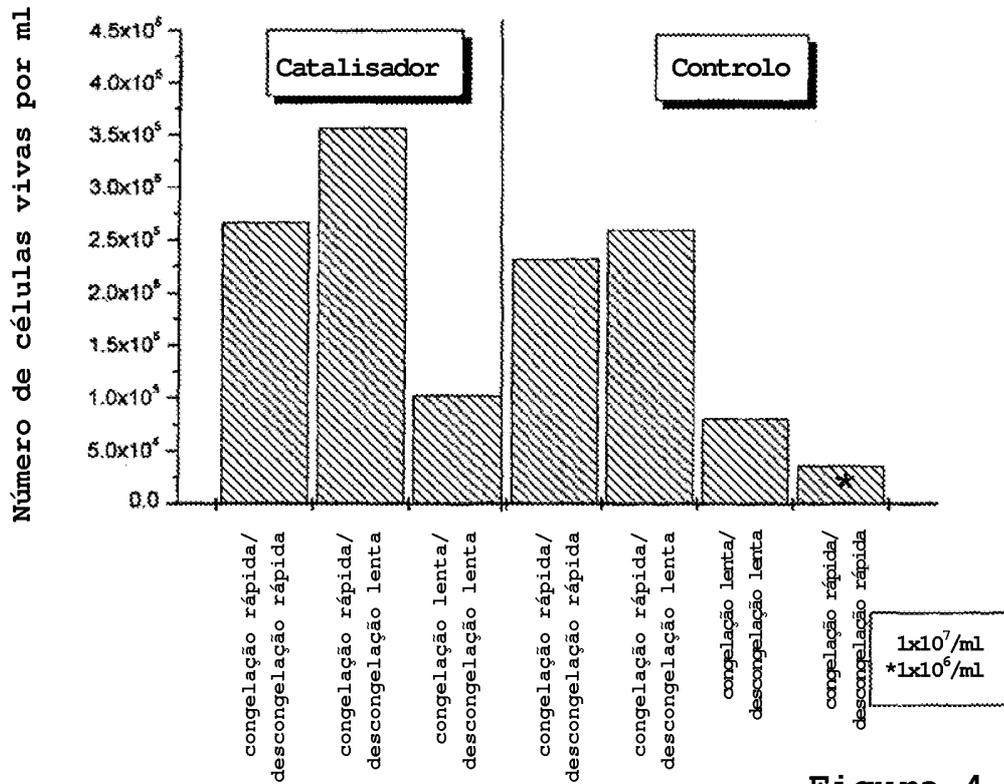


Figura 4