



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0413721-3 B1**

**(22) Data do Depósito:** 08/09/2004

**(45) Data de Concessão:** 14/11/2017



\* B R P I 0 4 1 3 7 2 1 B 1 \*

---

**(54) Título:** SOBREVIDA PÓS-DESCONGELAMENTO AUMENTADA DE MATERIAL BIOLÓGICO CRIOPRESERVADO POR ESTÍMULO DE PRESSÃO HIDROSTÁTICA

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

**(52) CPC:** A01N 1/0289

**(30) Prioridade Unionista:** 09/09/2003 HU P0302888, 31/12/2003 HU P0304124

**(73) Titular(es):** APPLIED CELL TECHNOLOGY KORLÁTOLT FELELŐSSÉGU TÁRSASÁG

**(72) Inventor(es):** CSABA PRIBENSZKY; MIKLÓS MOLNÁR

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SOBREVIDA PÓS-DESCONGELAMENTO AUMENTADA DE MATERIAL BIOLÓGICO CRIOPRESERVADO POR ESTÍMULO DE PRESSÃO HIDROSTÁTICA"**.

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a um método para aumentar a sobrevida pós-descongelamento de material biológico criopreservado compreendendo aplicar pressão hidrostática ao referido material biológico; manter o referido material biológico na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado; liberar a pressão hidrostática; e congelar o referido  
10 material biológico usando qualquer protocolo aplicável ao mesmo. A invenção também refere-se ao uso de um dispositivo de pressurização para o pré-tratamento de um material biológico que está para ser criopreservado, bem como a um dispositivo de pressurização para o pré-tratamento de um material biológico que está para ser criopreservado, o dispositivo referido compreendendo uma câmara de pressão para receber material biológico, meios  
15 para produzir a pressão referida, e meios para manter a pressão referida dentro da câmara referida.

Antecedentes da Técnica

O processo de criopreservação está bem estabelecido para armazenar material biológico para uma ampla variedade de propósitos em diferentes campos da biologia e biotecnologia moderna.

Estes métodos seguem etapas básicas muito semelhantes:

1. Tratamento do material biológico com uma solução contendo um ou mais agentes crioprotetores.
- 25 2. A etapa seguinte compreende congelamento do material biológico até temperatura abaixo de zero.
3. O material biológico preparado deste modo é armazenado - mesmo por períodos de tempo muito longos - em baixa temperatura, por exemplo, em nitrogênio líquido.
- 30 4. Antes do uso o material biológico é reaquecido.
5. O(s) agente(s) crioprotetor(es) é(são) removido(s) do material biológico. Além disso, o material biológico pode requerer etapas adicionais

para restaurar sua viabilidade original.

Foram tentadas várias abordagens para aumentar este protocolo básico resumido acima, uma vez que o processo de criopreservação é perigoso para o material biológico. Abordagens para evitar a formação de gelo através de índices de resfriamento ultra-rápido e de aquecimento ou por depressão gradual do ponto de congelamento de equilíbrio durante resfriamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  não deram uma solução apropriada para todo campo da criobiologia. Foram feitas tentativas para aumentar a sobrevivência depois de congelamento: em vitrificação soluções aquosas altamente concentradas de agentes crioprotetores superfrios até temperaturas muito baixas, permitindo a vitrificação intracelular (Rall e Fahy, 1985). Apesar de Fahy et al. (1984) mencionarem o uso possível de pressão hidrostática consideravelmente aumentada como um fator adicional que pode facilitar a vitrificação, mas também consideraram que teve poucas consequências práticas em biologia reprodutiva. Outros estudos reportam o uso de proteínas anticongelamento (AFPs) as quais reduzem não-coligativamente o ponto de congelamento de soluções aquosas, bloqueiam canais iônicos das membranas e deste modo conferem um grau de proteção durante o resfriamento (Baguisi et al., 1997). Os efeitos tóxicos dos crioprotetores e as consequências prejudiciais das alterações osmóticas não são desprezíveis em qualquer um dos métodos descritos.

Estes procedimentos, atualmente, têm um grau variável de eficiência para várias aplicações. Por exemplo, no caso da preservação de embriões, a eficiência da criopreservação varia de 0 a 80 por cento, dependendo da espécie, do método de congelamento, do estágio do desenvolvimento embrionário (Ishwar, 1996; Van Wagtenonk-De Leeuw, 1995, 1997; Medeiros, 2002; Reubinoff, 2001; Hammita, 2003; Archer, 2003; Stachecki, 2002, Leibo e Songsasen, 2002). Os índices de sucesso para a criopreservação de óvulos humanos, sendo atualmente um problema popular, também estão longe de serem satisfatórios.

Desde 1912 se sabe que a água passa por diferentes fases quando submetida a pressão hidrostática em diferentes temperaturas (Bridgman, 1911) (Figura 7). Soluções podem ser mantidas descongeladas

mesmo em baixas temperaturas abaixo de zero aplicando uma determinada pressão às mesmas (Bridgeman, 1970). Foi previamente usada alta pressão hidrostática (HHP) por Takahashi et al. (2000, 2001) na preservação abaixo de zero de fígados de rato para transplante de modo a reduzir criolesões.

5 Esta abordagem usa alta pressão hidrostática para reduzir substancialmente o ponto de congelamento do meio de cultura, de modo preservando o material biológico em temperatura abaixo de zero sem qualquer um dos efeitos negativos da criopreservação. Esta abordagem foi considerada inviável pelos inventores presentes na preservação de embriões de camundongo, con-

10 forme resumido abaixo nos exemplos 2 e 3.

Pressão hidrostática dentro da faixa de 30 a 50 MPa geralmente inibe o crescimento de vários organismos: o início da replicação do DNA é um dos processos intracelulares mais sensíveis à pressão (Abe et al., 1999). Os efeitos variam de gravidade dependendo da magnitude e da duração da

15 compressão (Murakami e Zimmerman, 1973). A membrana celular é observada como um sítio primário de dano de pressão (Palou et al., 1997). O tratamento com alta pressão hidrostática pode alterar a funcionalidade da membrana tal como transporte ativo ou permeabilidade passiva e portanto perturbar o equilíbrio físico-químico da célula (Yager e Chang, 1983; Aldridge e Bruner, 1985 ; Macdonald, 1987; Schuster e Sleytr, 2002). Um recente

20 estudo por Routray et al. (2002) mostrou que a pressão hidrostática (5 MPa) facilitou a apreensão de DMSO no experimento conduzido com ovos e embriões de medaka (*Oryzias latipes*), embora houvesse uma rápida perda na viabilidade. Os processos físicos ou bioquímicos em condições de pressão

25 alterada são governados pelo princípio de Le Chatelier: todas as reações que são acompanhadas por uma redução de volume aceleram consideravelmente (Murakami e Zimmerman, 1973; Welch et al., 1993; Palou et al., 1997). A aplicação de pressão pode levar a uma população de conformeros de proteínas, inclusive conformações parcialmente ou completamente des-

30 dobradas. A pressão pode causar a desnaturação de proteínas pelos efeitos combinados de rompimento de interações intraproteína e liberação de cavidades seguida pela ligação de água (Schmid et al., 1975; Weber e Dricka-

mer, 1983; Jaenicke, 1991; Gross e Jaenicke, 1994; Silva et al., 2001).

Relatórios recentes declaram que a pressão hidrostática aumenta a produção de proteínas de choque (Welch et al., 1993; Wemekamp-Kamphuis et al., 2002). Estudos descrevem que instabilidades causadas por choque a frio subletal na síntese protéica normal em bactérias são superadas pela síntese das chamadas proteínas de choque a frio (CSPs, HSPs) (Phadtare et al., 1999). Suspeita-se que CSPs, HSPs tenham muitas funções tais como chaperones de RNA (Graumann e Marahiel, 1999) ou ativadores de transcrição (LaTena et al., 1991) ; presumiu-se que elas também desempenham um papel na proteção contra congelamento (Wouters et al., 1999). Investigações posteriores descobriram que a produção de CSPs e HSPs é não somente induzida por choque a frio, mas por outros estresses ambientais também. Em *E. coli*, por exemplo, um tipo de CSP é produzido por stress nutricional (Yamanaka et al., 1998). Outro experimento mostrou que tratamento por alta pressão hidrostática provocou a produção de determinadas proteínas induzidas pelo frio e proteínas de choque térmico (Welch et al., 1993). Outros relatórios recentes determinam que a pressão hidrostática aumenta a produção de proteínas de choque (Wemekamp-Kamphuis, et al., 2002). Como choque a frio e tratamento de alta pressão ambos aumentam os níveis de CSP e HSP, foram conduzidos experimentos sobre a possibilidade de proteção cruzada. Wemekamp-Kamphuis et al. (2002) descobriram que o nível de sobrevivência depois da pressurização de *Listeria monocytogenes* submetida a choque a frio foi 100 vezes maior do que o das células cultivadas a 37 °C.

Enquanto os microbiologistas alimentares estudam os processos mencionados acima de modo a matar microorganismos prejudiciais (Butz and Ludwig, 1986; Wemekamp-Kamphuis et al., 2002; Spilimbergo et al., 2002), o objetivo da presente invenção é aumentar a sobrevivência de material biológico criopreservado.

Mais atenção foi dada recentemente ao estudo do papel das proteínas de choque na criopreservação. Huang et al. (1999) publicaram que uma redução substancial de uma proteína de choque, HSP90, pode estar

associada com um declínio na motilidade dos espermatozóides durante o resfriamento dos espermatozóides de varrão. Wen-Lei et al. (2003) reportaram que HSP90 em espermatozóides humanos foi reduzido substancialmente depois de criopreservação que pode resultar da degradação da proteína.

5           Como um resumo, HSP90, que é induzido por alta pressão hidrostática é: -Proteína citosólica Chaperone molecular de Proteína citosólica, desempenha um papel essencial na tolerância ao stress, dobramento de proteínas, transdução de sinal, e etc.

10           -Foi demonstrado que possui uma ATPase inerente que é essencial para a ativação de proteínas clientes autênticas in vivo (Pearland Prodromou, 2000).

          Associada com a motilidade do espermatozóide: -Ativam síntese do óxido nítrico (NOS) (Garcia-Gardena et al., 1998) -Protege células de espécies oxigênio reativas (ROS) (Fukuda et al., 1996), as quais aumentam significativamente durante o processo de resfriamento e reduz bastante a motilidade do espermatozóide

15           - Envolvida no metabolismo do ATP (Prodromou et al., 1997). O nível de ATP está diminuído depois de choque a frio, e não seria restaurado posteriormente (Watson, 1981) -HSP 90 diminuiu substancialmente junto com o declínio da motilidade dos espermatozóides depois de resfriamento de sêmen de varrão. Foi concluído, que HSP 90 pode desempenhar um papel crucial na regulação da motilidade dos espermatozóides porcos (Huang et al., 1999) -Geldanamicina, um inibidor de HSP 90 específico, reduziu significativamente a motilidade dos espermatozóides de sêmen de varrão em uma maneira dose- e tempo dependente (Huang et al., 2000).

25           HSP90 diminuiu substancialmente depois de criopreservação em espermatozóides humanos, junto com a motilidade dos espermatozóides; a redução não foi devido a vazamento, mas uma consequência da degradação da proteína (Wen-Lei CAO et al., 2003).

30           O acúmulo dos efeitos de pressão é letal além de um determinado nível: enquanto ocorrem alterações irreversíveis de algumas biomoléculas em maiores pressões, a 300 MPa morre a maioria das bactérias e dos

organismos multicelulares. Embora tardígrados - em seu estado ativo morrem entre 100 a 200 MPa - podem sobreviver até 600 MPa se estiverem em um estado de 'tonel' desidratado (Seki e Toyoshima, 1998).

Os presentes inventores descobriram inesperadamente que aplicando um estímulo de pressão hidrostática, e em seguida seguindo o estado dos protocolos de criopreservação da técnica, a sobrevida do material biológico pode ser aumentada significativamente. No contexto da presente invenção, o termo sobrevida significa, entre outros, melhora continuada do desenvolvimento in vitro e in vivo, maiores índices de incubação ou implantação e nascimento (no caso de embriões); maior motilidade pós descongelamento e/ou capacidade aprimorada para fertilização (no caso de espermatozóides); melhora continuada do desenvolvimento in vitro e in vivo, melhora da capacidade para ser fertilizado, maiores índices de incubação ou implantação e nascimento (no caso de oócitos).

Se reconhece que o termo sobrevida pode englobar outras diferentes características funcionais dependendo do tipo de outro material biológico tratado.

Para este fim foi estabelecida a tolerância à pressão de determinados tipos de materiais biológicos (veja o exemplo 1, 5, e 6), seguida pela investigação de vários conceitos do estado da técnica para atingir o objetivo de melhorar a sobrevida de material biológico pressurizado (veja os exemplos 2 e 3). Em seguida os presentes inventores investigaram adicionalmente os efeitos de tratamento de pressão sobre diferentes tipos de material biológico e surpreendentemente viram que o método de estímulo de pressão da invenção satisfaz seus objetivos.

Neste contexto deve-se enfatizar que o presente conceito da invenção se aplica igualmente a muitos protocolos de criopreservação diferentes, e a escolha destes não está limitada com respeito à invenção. A única etapa necessária a incluir nos protocolos aperfeiçoados é a etapa de estímulo de pressão hidrostática; cujos parâmetros podem ser facilmente otimizados por uma pessoa versada na técnica ao seguir os ensinamentos da presente descrição.

### Sumário da invenção

A presente invenção refere-se a um método para aumentar a sobrevida pós-descongelamento de material biológico criopreservado compreendendo

- 5 (a) aplicar pressão hidrostática ao referido material biológico, opcionalmente de acordo com um perfil de pressão-tempo predeterminado;
- (b) manter o referido material biológico na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado;
- (c) liberar a pressão hidrostática;
- 10 (d) congelar o referido material biológico usando qualquer protocolo aplicável ao mesmo.

Em uma modalidade, pressão usada no o método de acordo com a invenção está dentro do alcance de 1 a 250 MPa. Em modalidades preferenciais, a pressão é preferencialmente na faixa of 10 a 100 MPa, mais  
15 preferencialmente 20 a 75 MPa, e ainda mais preferencialmente 30 a 60 MPa.

Em outra modalidade, a pressão hidrostática usada no método de acordo com a invenção é aplicada por um período de tempo entre 1 segundo e 300 minutos. Em modalidades preferenciais, a pressão é aplicada  
20 preferencialmente por um período de tempo entre 1 segundo e 150 minutos, mais preferencialmente entre 1 segundo e 90 minutos, e ainda mais preferencialmente entre 1 segundo e 60 minutos.

Em outras modalidades, o método de acordo com a invenção compreende a liberação gradual da pressão durante um período de tempo entre 1 segundo e 4 horas. Em outras modalidades o período de tempo para  
25 liberar a pressão é entre 10 segundo e 2 horas, ou entre 1 minuto e 1 hora, ou em outros casos entre 10 min e 30 min. A liberação de pressão também pode ser instantânea.

Em uma modalidade preferencial o método de acordo com a invenção é usado em conexão com material biológico selecionado entre o  
30 grupo consistindo em oócitos, espermatozóides, zigotos, mórulas, blastócistos, embriões, células-tronco, células ou tecidos de um animal vertebrado.

Outras modalidades preferenciais referem-se a um método em que o referido animal vertebrado é um peixe, uma ave ou um mamífero, preferencialmente bovino, eqüino, caprino, ovino, suíno, outras criações, animais de estimação, primatas, inclusive seres humanos.

5           A presente invenção também refere-se a um dispositivo de pressurização para o tratamento de pressão de material biológico, compreendendo:

- uma câmara de pressão para receber material biológico;
- meios para produzir pressão variando de 1 a 250 MPa, preferencialmente de 10 a 100 MPa, mais preferencialmente de 20 a 75 MPa, e  
10           ainda mais preferencialmente de 30 a 60 MPa; e
- meios para manter a referida pressão dentro da referida câmara por um período de tempo entre 1 segundo e 300 minutos, preferencialmente entre 1 segundo e 150 minutos, mais preferencialmente entre 1 se-  
15           gundo e 90 minutos, e ainda mais preferencialmente entre 1 segundo e 60 minutos.

Em uma modalidade preferencial a presente invenção refere-se a um dispositivo em que

- o referido meio para produzir pressão é um pistão e a referida  
20           câmara de pressão é uma câmara cilíndrica recebendo o referido pistão;
- são proporcionados meios para vedação de alta pressão entre a câmara e o pistão e
- são proporcionados meios operados manualmente e/ou automaticamente para aplicar força sobre o referido pistão.

25           Em outra modalidade preferencial a presente invenção refere-se a um dispositivo, em que o meio referido para aplicar força sobre o referido pistão é um elemento semelhante a uma placa tendo uma superfície em contato com o referido pistão, e há meios para ajustar a posição do referido pistão dentro da referida câmara.

30           Em outras modalidades preferenciais o dispositivo compreende um sistema para controlar a despressurização da câmara de pressão durante um período de tempo entre 1 segundo e 4 horas.

Em outras modalidades preferenciais o dispositivo compreende adicionalmente um calibre de pressão para indicar a pressão da câmara.

Em outra modalidade preferencial a câmara de pressão referida contém meio líquido.

5           Em modalidades específicas a referida câmara de pressão tem uma parede de cerca de 10 a 25 mm de espessura, preferencialmente de menos de 20 mm de espessura, a câmara referida tendo um diâmetro interno preferencialmente menor que 100 mm, mais preferencialmente menor que 50 mm, particularmente cerca de 20 mm, e uma altura interna preferen-  
10 cialmente menos de 250 mm, mais preferencialmente menos de 100 mm, particularmente cerca de 200 mm.

Em outra modalidade preferencial a invenção refere-se a um dispositivo em que o referido material biológico é selecionado entre o grupo consistindo em oócitos, espermatozóides, zigotos, mórulas, blastócistos,  
15 embriões, células-tronco, células ou tecidos de um animal vertebrado.

A presente invenção também refere-se ao uso de um dispositivo de pressurização para a compressão de material biológico.

Em uma modalidade preferencial a invenção refere-se a um uso de um dispositivo de pressurização em que a pressurização é usada como  
20 pré-tratamento para a criopreservação do referido material biológico.

Em modalidades preferenciais, o uso de um dispositivo de pressurização pode incorporar quaisquer dos procedimentos de criopreservação da invenção.

Em modalidades preferenciais, o uso da invenção envolve um  
25 dispositivo de pressurização, o qual inclui uma câmara de pressão adequada para receber o material biológico, e meios para proporcionar pressão controlada dentro do alcance de 1 a 250 MPa preferencialmente 10 a 100 MPa, mais preferencialmente 20 a 75 MPa, e ainda mais preferencialmente 30 a 60 MPa.

30           Em outras modalidades preferenciais, o uso da invenção envolve um dispositivo de pressurização, o qual compreende meios para manter a referida pressão por um período de tempo entre 1 segundo e 300 minutos,

preferencialmente entre 1 segundo e 150 minutos, mais preferencialmente entre 1 segundo e 90 minutos, e ainda mais preferencialmente entre 1 segundo e 60 minutos.

Em uma modalidade preferencial o uso da invenção engloba o uso de um sistema controle em conexão com o dispositivo de pressurização para controlar a despressurização da câmara de pressão durante um período de tempo entre 1 segundo e 4 horas.

Em modalidades específicas a invenção também refere-se a um uso de um dispositivo de pressurização em que pressão hidrostática está sendo obtida no dispositivo de pressurização.

Em outra modalidade preferencial a invenção refere-se ao uso de um dispositivo de pressurização, em que o referido material biológico é selecionado entre o grupo consistindo em oócitos, espermatozóides, zigotos, mórulas, blastocistos, embriões, células-tronco, células ou tecidos de um animal vertebrado.

A invenção refere-se adicionalmente ao uso do dispositivo de pressurização de acordo com a invenção para a compressão de material biológico.

#### Descrição detalhada

A presente invenção é descrita em mais detalhes usando embriões de camundongo para o fim de demonstrar o conceito da invenção. Deve ser evidente que os procedimentos descritos se aplicam igualmente a todo tipo de diferentes materiais biológicos os quais são rotineiramente criopreservados na técnica. Por motivo de fácil acesso e manipulação, embriões de camundongo foram selecionados como a matéria detalhada investigação. É desnecessário dizer que a criopreservação de embriões é a vanguarda da pesquisa de criopreservação devido a sua aplicabilidade industrial e de tratamento de saúde. No entanto, no método de acordo com a invenção e similarmente na presente descrição, o termo 'embrião de camundongo' pode ser usado de modo intercambiável com o termo 'material biológico'. No presente relatório descritivo, também são apresentados dados experimentais para embriões IVF bovinos e espermatozóide de touro, proporcionando sobrevida

pós-descongelamento inesperadamente aumentada. Material biológico típico pode ser, por exemplo, estágios pré- e pós-implantação de embriões de diferentes espécies mamíferas, oócito, espermatozóide, células-tronco, tecidos, órgãos de animais vertebrados e seres humanos, ou mesmo o corpo inteiro.

- 5 O animal vertebrado pode ser de qualquer espécie, por exemplo, um peixe, uma ave ou um mamífero, preferencialmente bovino, eqüino, caprino, ovino, suíno, outras criações, animais de estimação, primatas, inclusive seres humanos.

Como organismos eucarióticos altamente desenvolvidos, os embriões de camundongo são mais suscetíveis ao efeito da pressão hidrostática do que tardígrados e bactérias. O primeiro objetivo portanto é estabelecer as características básicas dos embriões de camundongo sob pressão referentes a sua morfologia e sobrevida.

Para a completa investigação do método da presente invenção, foi fabricado um protótipo de dispositivo. O dispositivo de pressurização 1, representado na Figura 8, foi usado para conduzir os experimentos discutidos nos exemplos a seguir.

O dispositivo de pressurização 1 compreende uma câmara de pressão cilíndrica 2 tendo duas aberturas 3, 4 uma no topo e uma no fundo com um calibre de pressão 5 sendo fixado à abertura do topo 3 e um pistão 6 sendo inserido através da abertura do fundo 4. O calibre de pressão 5 pode ser qualquer calibre adequado contanto que seja capaz de medir a pressão na região de interesse, isto é, dentro do alcance de 1 a 250 MPa, preferencialmente 10 a 100 MPa, mais preferencialmente 20 a 75 MPa, e ainda mais preferencialmente 30 a 60 MPa. A câmara de pressão 2 tem uma altura interna de cerca de 60 mm e uma largura de cerca de 20 mm. A parede 7 da câmara 2 é adaptada para suportar pressões até 250 MPa, preferencialmente no mínimo até 75 MPa, e ainda mais preferencialmente até 60 MPa. A parede 7 da câmara 2 é preferencialmente feita de um material resistente à corrosão, o qual é preferencialmente plástico ou aço inoxidável. Para reforçar o firme encaixe entre o lado interno da parede 7 na abertura do fundo 4 e o pistão 6, o último é provido com uma vedação de pressão circumferencial

8, tal como por exemplo, uma vedação de anel de Teflon. Semelhante vedação ou outro tipo de vedação de pressão 8 é preferencialmente também usada na abertura do topo 3 onde o calibre de pressão 5 é encaixado. A parte da parede 7 circundando a abertura do fundo tem uma protrusão periférica formando um flange 9. A câmara de pressão 2 é adicionalmente equipada com uma tampa espessa 10 para reter e mover o pistão 6 adicionalmente dentro da câmara 2. A tampa 10 pode ser fixada ao flange 9 por meios de fixação tais como parafusos 11. A força de tração de cada parafuso pode ter um valor apropriadamente elevado para resistir a forças de tração devido à alta pressão dentro da câmara 2. A câmara de pressão 2 é enchida com um meio 12 adequado para produzir alta pressão durante compressão comparativamente pequena, a qual é estabelecida forçando o pistão adicionalmente dentro da câmara de pressão 2. O meio referido pode ser qualquer tipo conhecido de meio não sólido 12 (preferencialmente fluido ou meio gelatinoso 12) aplicável no campo da tecnologia de alta pressão, no entanto, para os fins da investigação, foi usada água comum. Para prevenir o aquecimento do meio 12 durante a compressão a parede 7 da câmara de pressão 2 é preferencialmente de um material termo-condutivo.

Será reconhecido que o dispositivo de pressurização 1 descrito acima pode ser construído com semelhantes diâmetros de modo a oferecer meios portáteis para implementar o método de criopreservação aperfeiçoado da presente invenção. As seguintes medidas servem somente como um exemplo e se entende que uma pessoa versada na técnica pode facilmente imaginar tanto modalidades maiores quanto menores. A câmara de pressão 2 tem uma altura interna  $H$  de 60 mm e um diâmetro interno  $D$  de 20 mm, o qual também corresponde ao diâmetro do pistão 6. A altura  $H_p$  do pistão 6 pode ser selecionada proporcionalmente a  $H_i$ , por exemplo, no dispositivo de teste curto que foi de 20 mm. A parede 7 da câmara 2 tem uma espessura  $D_w$  de cerca de 10mm. A vedação de pressão 8 em torno do pistão 6 tem uma altura  $H_s$  de 5 mm e uma espessura  $D_s$  de 2 mm. Os parafusos 11 usados para fixar a tampa 10 ao flange 9 podem ter um diâmetro  $D$  de 8 mm. Parafusos 11 disponíveis comercialmente desta medida podem ter uma for-

ça de tração de 800 MPa, a qual é suficiente para assegurar uma pressão até 200 MPa. A calibragem real do dispositivo pode ser designada de acordo com o material biológico a ser tratado e os meios disponíveis para aplicar o material biológico dentro do dispositivo.

5 Durante o pré-tratamento dos embriões de camundongo a serem criopreservados, os embriões (pré-carregados em canudo plástico com solução apropriada para conter embrião) foram colocados dentro da câmara de pressão 2 no meio fluido 12 (o último sendo água comum); o pistão 6 foi inserido na abertura do fundo 4 sem aplicar qualquer força extra sobre o  
10 mesmo, e a tampa 10 foi fixada ao flange 9 da câmara 2 por meio dos parafusos 11 em uma posição em contato com o pistão 6, o qual, no estado não comprimido do meio 12, se projeta parcialmente da câmara 2. Depois disso, a tampa foi puxada mais próxima da abertura do fundo 4 para forçar o pistão 6 adicionalmente dentro da câmara de pressão 2 apertando os parafusos (ou  
15 manualmente ou por um automatismo de aparafusamento) em um índice e em tal extensão de modo a atingir as condições de pressão requeridas para o experimento em particular que está sendo conduzido. A pressão resultante dentro da câmara 2 foi monitorada pelo calibre de pressão 5. Depois de ter passado o período de tempo desejado ocorreu a despressurização da câmara  
20 ou afrouxando gradualmente os parafusos 11 ou tirando o calibre de pressão 5 da abertura do topo deste modo deixando o meio fluido 12 expandir em um modo quase instantâneo.

O meio para colocar os embriões dentro da câmara não está limitado a canudo plástico.

25 Dependendo da aplicação específica e do material biológico, a amostra a ser tratada pode ser colocada dentro de diferentes estruturas de contenção. Por exemplo, embriões ou células podem ser colocados sobre criolças ou grades de microscopia eletrônica. Em uma modalidade diferente, uma gota de solução de contenção com o material biológico pode ser  
30 simplesmente coberta com óleo mineral como o meio fluido 12. Neste caso, todo o dispositivo de pressurização pode ser miniaturizado, deixando-o ajustado sob um estereomicroscópio para permitir fácil recuperação. No caso de

material biológico macroscópico, não há necessidade de meios de colocação específicos, a amostra pode ser colocada dentro da câmara, e o próprio meio fluido 12 pode ser a solução de contenção. Quaisquer meios para colocar e/ou conter o material biológico dentro da câmara que permita que ocorram os efeitos de alta pressão hidrostática sobre o material biológico, estão dentro do âmbito da invenção.

O dispositivo de pressurização 1 pode ser totalmente automatizado proporcionando um sistema controle programável. Semelhante sistema controle pode incluir o seguinte como parâmetros de entrada: índice de ganho de pressão, tempo desejado em máxima pressão e índice de liberação da pressão. Também podem ser usados meios de controle da temperatura, embora ter material altamente termocondutor como a parede 7 da câmara de pressão 2 possa se comprovar suficiente para prevenir variações de temperatura perigosas. O meio de controle da temperatura pode ser previsto para ser como um dispositivo de pressurização-congelamento integrado para proporcionar uma solução de uma etapa para o processo de criopreservação. Neste cenário tanto os componentes de pressurização quanto de congelamento podem ser automatizados e equipados com meios para programar o tratamento de pressão e congelamento de acordo com as necessidades dos diferentes materiais biológicos.

Também é previsto um dispositivo portátil o qual pode ser muito semelhante à unidade de teste descrita acima e o qual proporcionaria modo fácil e simples para tratar material biológico, em seguida esta etapa pode ser seguida por tecnologias prontamente disponíveis para preservar o referido material biológico. Semelhante abordagem ajudaria os profissionais em localizações remotas, ou podem ser usadas em diferentes projetos, tais como conservação da vida selvagem.

Foram conduzidos experimentos cuidadosamente planejados para investigar a tolerância à pressão de diferentes materiais biológicos. A escolha da escala de pressão e tempo usada foi definida para dar o mais amplo alcance aplicável para aplicações práticas posteriores. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 7, a temperatura da água da alteração de fase

diminui com a pressão a partir de 0°C a 0,1 MPa até -21°C a 210 MPa e o efeito oposto é observado acima deste nível de pressão. Portanto, a pressão para uso no método de acordo com a invenção é selecionada dentro do alcance de 1 MPa até 250 MPa, ou mesmo até o ponto onde o meio congela na temperatura de operação do dispositivo. Mais particularmente, a pressão hidrostática que pode ser aplicada aos embriões do estágio de blastocisto expandido é 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200 ou 250 MPa, ou qualquer valor dentro destas faixas intermediárias.

10 A pressão hidrostática pode ser aplicada ao referido material biológico de acordo com um perfil de pressão-tempo predeterminado. Será reconhecido pelas pessoas versadas na técnica que, dependendo do material biológico a ser tratado, a pressão aplicada ao material pode ser aumentada gradualmente durante o tempo. O perfil apropriado para um dado material biológico pode ser determinado empiricamente, e pode ser linear, em etapas, ou outro perfil de tempo usado convencionalmente.

15 Similarmente, pode ser selecionado um amplo período de tempo para o material biológico a ser mantido sob alta pressão hidrostática. Mais particularmente, os embriões de camundongo são mantidos sob a pressão selecionada por um período de tempo entre 1 segundo e 6 horas, mais especificamente 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 da pressão.

25 É reconhecido pelas pessoas versadas na técnica que o tempo entre o fim da pressão pré-tratamento e o início da criopreservação pode ser consideravelmente diferente em modalidades específicas. Dependendo do protocolo dado, o estado do material biológico pode mudar nesta janela de tempo. Este período pode permitir a recuperação física das células caso suficientemente longo ou, ao invés, podem começar processos celulares, isto é, podem ocorrer a síntese e o acúmulo de proteínas de choque. Em diferen-

tes circunstâncias estes efeitos podem se comprovar ou benéficos ou prejudiciais; portanto pode ser necessária a otimização do protocolo a este respeito através de experimentação.

A Figura 1 mostra que os embriões podem sobreviver a uma  
5 quantidade de pressão substancial sem qualquer alteração visível em sua morfologia (por exemplo, 90 MPa por 1 s ou 30 MPa por 2 h). Os embriões compactaram dependendo da magnitude e da duração do tratamento de pressão aplicado. Sem limitar o âmbito da invenção pela teoria, presume-se que a pressão não pode ser diretamente responsável por comprimir a água  
10 dos blastocistos. Com base nos documentos citados, a compactação dos embriões foi devido às conseqüências da produção de diferentes proteínas induzida por pressão (proteínas de choque a frio, CSPs), alterações reversíveis na estrutura protéica e processos metabólicos. Os embriões compactados podem recuperar sua morfologia normal depois de 4 a 5 horas de cultura  
15 in vitro, e recuperar o desenvolvimento similarmente aos controles (por exemplo, embriões estimulados por 90 MPa durante 30 min ou 30 MPa durante 3 horas).

Sem limitar o âmbito da invenção pela teoria, pode ser postulado a partir dos estudos com embriões bovinos IVF que a compactação não é  
20 um critério para a pressão ótima pré-tratamento. A compactação pode ser o resultado de permeabilidade da membrana alterada por pressão, difusão alterada e transporte ativo através das membranas celulares. Esta alteração reversível na morfologia pode ser considerada como um 'sinal' morfológico o qual marca que o embrião foi tratado com um impacto 'subletal'. De acordo  
25 com a literatura, o choque 'subletal' é um impacto que induz a produção das chamadas 'proteínas de choque', as quais se suspeita que desempenhem um papel no aumento do índice de sucesso da criopreservação.

No entanto, em determinadas aplicações, os embriões compactados podem preferencialmente ser selecionados para criopreservação. De-  
30 pois de pressurização, blastocistos expandidos se tornam compactados e permanecem desta forma por 3 a 4 horas, em seguida eles expandem novamente. Com base neste fenômeno, podem ser selecionados embriões tra-

tados com pressão antes do processo de congelamento. Como as alterações morfológicas dos embriões e os efeitos benéficos do pré- tratamento de pressão podem provir da estrutura protéica alterada e/ou características e/ou o aumento da produção de diferentes proteínas induzidas por pressão, o  
5 exame destas proteínas pode ser indicativo da alta pressão hidrostática aplicada ao material biológico antes do processo de criopreservação.

O pré-tratamento de pressão também se correlaciona em um determinado grau com o tempo quando os embriões recuperam seu desenvolvimento normal depois da criopreservação. A observação deste processo  
10 pode indicar a natureza de um pré-tratamento, uma vez que ao usar alta pressão hidrostática pode-se encurtar consideravelmente o tempo necessário para regeneração.

Quanto maior a magnitude da pressão, menos tempo os embriões sobrevivem. Impacto de pressão excedendo uma determinada magnitude e duração causou alterações irreversíveis: os embriões se tornaram desintegrados depois de 2 horas de cultura in vitro ou já estavam desintegrados depois da descompressão (por exemplo, embriões estimulados por 90 MPa durante 2 h ou 30 MPa durante 5 h). As pessoas versadas na técnica devem ser capazes de determinar estas pressões limite e tempos limite por  
20 meio de experimentação de rotina com respeito ao material biológico específico usado.

Será reconhecido que o índice de sobrevivência dos embriões pressurizados pode ser aumentado por descompressão gradual dos mesmos. Estudos mostraram que o índice de sobrevivência dos embriões pressurizados aumentou notavelmente se eles foram recuperados gradualmente.  
25 Enquanto 60 minutos a 90 MPa foi letal para todos os embriões, 80 % sobreviveram quando foram usados 120 min de descompressão gradual. O tempo de descompressão também é uma característica da presente invenção o qual fica a critério das pessoas versadas na técnica determinarem em  
30 vista da aplicação específica. Mais particularmente, os embriões de camundongo mantidos sob a pressão selecionada são descomprimidos por um período de tempo entre 1 segundo e 4 horas, mais especificamente 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 ou 240 min. Similarmente à aplicação da pressão, a descompressão pode ser feita de acordo com um perfil de pressão-tempo predeterminado.

Novamente, sem ser limitada pela teoria, uma possível explicação desta característica pode ser que uma considerável quantidade de  $\text{CO}_2$  é produzida sob pressão (Abe e Horikoshi 1995). A hidratação e ionização de  $\text{CO}_2$  ( $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ ) são facilitadas por elevada pressão porque a reação é acompanhada por uma redução no volume ( $n^\circ 0.26 \text{ ml/mol}$ ) em uma maneira dependente da magnitude da pressão aplicada (Palou et al. 1997, Welch et al. 1993). O dióxido de carbono produzido intracelularmente se dissolve instantaneamente, e em seguida se dissocia dando  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ , deste modo também reduzindo o pH intracelular (Abe e Horikoshi 1995, 1997, 1998, Abe et al. 1999). Pode ser presumido que o equilíbrio mantido por elevada pressão é letal para os embriões em pressão atmosférica. Também pode ser sugerida a hipótese de que a redução da pressão instantânea causa liberação elevada de  $\text{CO}_2$  de sua forma hidratada e ionizada a partir do citoplasma, provocando morte imediata dos embriões. Na condição de um determinado tempo de descompressão, as proteínas da membrana plasmática ( $\text{H}^+$ -ATPase) (Schmid et al. 1975, Péqueux e Gilles 1978) inativadas reversivelmente por elevada pressão hidrostática, começam a funcionar novamente, (junto com difusão passiva) mudando o equilíbrio gradualmente para o estado fisiológico.

Alta pressão hidrostática (HHP) foi previamente usada por Nakahashi et al. (2000, 2001) em preservação abaixo de zero de fígados de rato para transplante de modo a reduzir criolesões. Esta abordagem usa alta pressão hidrostática para reduzir substancialmente o ponto de congelamento do meio de cultura, deste modo preservando o material biológico em temperatura abaixo de zero sem quaisquer dos efeitos negativos da criopreservação. Para investigar este método de criopreservação no caso de embriões de camundongo, foram planejados estudos para pressurizar embriões a 0

°C. A sobrevida dos embriões foi significativamente reduzida. Enquanto em temperatura ambiente (RT) os embriões tiveram um índice de sobrevida médio de 90% a 30 MPa durante 45 min, nenhum dos embriões sobreviveu ao mesmo impacto a 0 °C. Depois de 10 minutos ou 5 minutos a 0 °C, 0% dos embriões sobreviveu a 60 MPa e a 90 MPa, respectivamente. Em contraste, em temperatura ambiente, o índice de sobrevida foi em torno de 90% em ambos os casos. Os embriões também foram pressurizados a 0 °C e foram descomprimidos gradualmente. A aplicação de descompressão gradual em baixa temperatura não teve um efeito benéfico sobre a sobrevida dos embriões. Com base nestes achados, o uso do fenômeno não é aplicável nesta forma, uma vez que pressão e baixa temperatura juntas se comprovaram letais para os embriões.

A presente invenção refere-se ao aumento da sobrevida pós-descongelamento de blastocistos de camundongo criopreservados por estímulo de pressão hidrostática. Isto pode ser avaliado transferindo os embriões pressurizados, seguindo seu tratamento por qualquer tipo de protocolo de criopreservação e descongelamento, para meio de cultura e/ou em recipientes pseudo-grávidos. Desenvolvimento in vitro, implantação e desenvolvimento uterino posterior e nascimento de filhotes saudáveis são prova óbvia de seu potencial biológico e genético.

Conforme foi revelado em detalhes acima, o índice de sobrevida de blastocistos de camundongo expandidos criopreservados pode ser melhorado por um determinado tratamento de pressão antes do procedimento de congelamento. Um impacto de pressão de 60 MPa durante 30 min foi aplicado ao blastocistos, onde aproximadamente 80% a 90% dos embriões se tornaram compactados e a sobrevida não foi diferente do controle não-tratado. De acordo com os resultados da avaliação in vitro, o tratamento de pressão aplicado melhora notavelmente o desenvolvimento in vitro dos embriões depois de congelamento. Estudos in vitro mostraram que o estímulo de pressão hidrostática não somente melhora o índice de sobrevida dos blastocistos tratados, mas também aumenta o tempo de recuperação necessário para os embriões recuperarem seu estado nativo. Em nossos estudos

típicos, depois de 6 horas, 98% dos blastocistos tratados com pressão foram morfológicamente (diâmetro, integridade estrutural, e morfologia geral) exatamente idênticos aos embriões de controle e 95% dos blastocistos eclodiram totalmente dentro de 20 horas, junto com os controles. Embriões congelados sem tratamento de pressão expandiram novamente somente 20 horas depois de descongelamento. A proporção dos blastocistos reexpandidos foi significativamente inferior aos recebendo tratamento de pressão (46 % vs. 98%). Além disso, nenhum embrião eclodiu deste grupo. Portanto, é evidente que o método de acordo com a invenção é adequado para obter embriões de camundongo altamente viáveis.

#### Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra o índice de sobrevivência dos embriões em diferentes pressões entre 10 MPa e 150 MPa (por 10 MPa) por diferentes tempos (1 s, 5 min, 15 min e 30 min até 300 min por intervalos de 30 min), em temperatura ambiente. Foram usados 14 a 16 embriões em cada grupo; cada experimento foi repetido 3 vezes. O índice de sobrevivência dos embriões nos campos marcados com 'a' e 'b' não é diferente do controle não-tratado ( $p < 0,05$ ).

A Figura 2 mostra os índices de sobrevivência de embriões pressurizados com 90 MPa durante 30, 60, 120 min e descomprimidos por 30 a 180 min. (Com sobrevivência de descompressão instantânea a 30, 60 e 120 min foi 50%, 0%, e 0%, respectivamente). Índices de sobrevivência marcados na figura com diferentes sobrescritos são significativamente diferentes uns dos outros ( $p < 0,05$ ).

A Figura 3a mostra a sobrevivência de embriões pressurizados com 30, 60 e 90 MPa por 1 segundo até 45 min, em temperatura ambiente.

A Figura 3b mostra a sobrevivência de embriões pressurizados com 30, 60 e 90 MPa por 1 segundo até 45 min, a 0 °C. Foram usados 12 a 15 embriões em cada um dos grupos; cada experimento foi repetido 3 vezes. São vistas diferenças significativas entre os grupos pressurizados em temperatura ambiente e a 0 °C ( $p < 0,01$ ).

A Figura 4 mostra os valores médios da motilidade dos espermatozoides.

tozóides (pressurizados e controle).

Figura 5 mostra a motilidade média do espermatozóide do Touro I depois de pressurização e congelamento-descongelamento.

A Figura 6 mostra a motilidade média do espermatozóide do  
5 Touro II depois de pressurização e congelamento-descongelamento.

A Figura 7 mostra o ponto de congelamento da água em diferentes pressões.

A Figura 8 é uma vista esquemática transversal de um possível dispositivo de pressurização de acordo com a presente invenção.

## 10 EXEMPLOS

Materiais e métodos para o exemplo, 1 a 4

### Animais experimentais e produção de embriões

Camundongos CB6F1 (Charles River, Alemanha) foram alojados sob condições de rotina (22  $\pm$  2°C ; 12 h de escuridão/12 h de luz; água e  
15 alimento à vontade).

As fêmeas foram superovuladas por injeção intraperitoneal de 10 UI de PMSG (Sigma, EUA) seguida por 10 UI de hCG (Sigma, EUA) 46 h depois. Depois de 6 horas de administração de hCG, as fêmeas foram combinadas com machos férteis em pares monógamos. Embriões no estágio de  
20 uma a duas células (Dia 0 e Dia 1) foram colhidos jateando o oviduto com meio FertiCult Flushing (FertiPro N. V., Bélgica). Os embriões foram cultivados a 37 °C em termostato com CO<sub>2</sub> a 5 % e máxima umidade em ar. Os embriões, entre estágios unicelular e de mórula compacta, foram cultivados em meio G 1.2 (Vitrolife, Suécia) sob óleo mineral, Ovoil (Vitrolife, Suécia).  
25 Em seguida, os embriões foram transferidos e cultivados em G 2.2 (Vitrolife, Suécia) sob Ovoil até o estágio de blastocisto expandido.

### Pressurização

Os blastocistos foram carregados em canudos plásticos sem bolhas de ar (7-9 embriões/ canudo), com M2 (Sigma, EUA), em seguida os  
30 canudos foram selados termicamente. Os canudos foram colocados dentro da câmara de pressão enchida com água como meio de pressão. O dispositivo de pressurização customizado, que foi capaz de proporcionar pressão

precisamente controlada dentro do alcance de 1 a 150 MPa foi feito de aço inoxidável com o diâmetro interno de 2 cm, e foi conectado a um calibre de pressão. Foi produzida pressão hidrostática pressionando-se um pistão para dentro da câmara de pressão através do controle manual de parafusos. A  
 5 obtenção da quantidade de pressão desejada tomou de 20 segundos a 5 min (10 MPa a 150 MPa, respectivamente); a duração da liberação da pressão foi de 3 segundos. Nos experimentos onde foram investigados os efeitos de descompressão gradual, o tempo de liberação foi entre 30-210 min. Em experimentos conduzidos a 0°C, a câmara de pressão foi mergulhada no  
 10 banho refrigerante de Bio-cool (FTS-Systems, NY, EUA).

#### Criopreservação com pressurização prévia

Os embriões foram alocados aleatoriamente para três grupos. Blastocistos do Grupo I foram criopreservados conforme mencionado abaixo, em uma solução de vitrificação contendo 7 M de Etileno glicol (EG) de acordo com Nowshari e Brem (1998). Os embriões do Grupo II foram tratados  
 15 com 60 MPa de pressão durante 30 min, em seguida foram congelados do mesmo modo. O Grupo III serviu como controle não-tratado. Depois de descongelamento, os embriões foram cultivados in vitro durante 24 horas.

#### Criopreservação

20 Os embriões foram equilibrados durante 5 min em uma solução contendo 1,5 M de etileno glicol (EG) (Sigma, EUA) e 0,25 M de sacarose em M2 (Sigma, EUA), suplementada com Soro de Feto de Vitelo a 10 % (FCS) (Sigma, EUA), e em seguida transferidos para uma solução de vitrificação (7 M EG, 0,5 M de sacarose em M2 com FCS a 10 %) pré-carregado  
 25 em um canudo plástico de 0,25 ml (7-9 embriões/canudo). Finalmente, os canudos foram selados termicamente. Depois de 1 min de exposição à solução de vitrificação, o canudo foi lentamente imerso em nitrogênio líquido. Os canudos foram descongelados por transferência em água a 30 °C durante 30 segundos e em seguida os embriões foram recuperados e colocados em  
 30 meio de reidratação (0, 5M de sacarose em M2 suplementado com FCS a 10%) durante 5 min. Em seguida os embriões foram cultivados em meio G 2.2 conforme descrito acima (Nowshari e Brem, 1998).

### Transferência de embriões

85] Os embriões foram cultivados em G 2.2 durante 2 horas como acima. Em seguida, eles foram separados em cada grupo experimental como 'mortos' e 'sobreviventes' e foram transferidos separadamente (7-12 embriões por animal) até recipientes pseudo-grávidos Dia 3. Blastocistos não-tratados foram transferidos como controles.

### Avaliação e análise estatística

A qualidade dos embriões foi examinada logo depois de liberar a pressão ou depois de descongelamento e depois de 2, 3, 4, 6, 12, 20 e 24 horas. A sobrevida dos embriões foi avaliada pelo aspecto morfológico: integridade dos blastômeros reexpansão do blastocele, e incubação da zona pelúcida foram os sinais de sobrevida. Blastocistos não-tratados foram usados como controles.

Para avaliação in vivo, embriões pressurizados foram cultivados em G 2.2 durante 2 horas como acima. Em seguida 7-12 embriões por animal foram transferidos para recipientes pseudo-grávidos Dia 3. Blastocistos não-tratados foram transferidos como controles. O nascimento de filhotes saudáveis foi prova de sobrevida dos embriões in vivo.

Os índices de sobrevida foram comparados com controle por teste qui-quadrado.

Exemplo 1. Sobrevida de embriões de camundongo em diferentes pressões em temperatura ambiente

Nos presentes experimentos os embriões foram expostos a diferentes pressões hidrostáticas de 10 a 150 MPa (por incrementos de 10 MPa) por vários tempos, entre 1 segundo a 300 min, em temperatura ambiente.

O tratamento excedendo uma determinada quantidade de pressão e tempo (Figura 1) provocou alterações morfológicas reversíveis. Blastocistos expandidos compactados dentro da zona pelúcida: o blastocele desapareceu, o tamanho dos blastômeros foi reduzido mas sua integridade estrutural não apresentou alteração. Depois de 4-5 horas de cultura in vitro estes blastocistos reexpandiram e eclodiram da zona pelúcida em 24 horas (a). Embriões recebendo menos impacto não apresentaram alteração morfo-

lógica e eclodiram dentro de 24 horas de cultura in vitro (b), ao passo que embriões estimulados com um maior impacto não reexpandiram a partir do estágio compactado e desintegraram dentro de 2 horas, ou já estavam desintegrados depois de descompressão (c) (Figura 1).

5                Para avaliação in vivo, os embriões estimulados foram considerados 'sobreviventes' (a e b) e 'mortos' (c) depois de 2 horas de cultura in vitro depois de descompressão e foram transferidos para recipientes separadamente. De 170 embriões 'a' e 'b' transferidos, 145 filhotes saudáveis nasceram (85%), mas 0 nasceram de 49 embriões 'c' (0%).

10              Não houve diferenças significativas entre o índice de incubação (in vitro) e o índice de nascimento (in vivo) do controle não-pressurizado, os embriões compactados e os não compactados pressurizados 'a' e 'b' ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados mostram que os embriões podem sobreviver a  
15 uma quantidade substancial de pressão sem qualquer alteração em seu índice de sobrevivência, embora quanto maior a magnitude da pressão, menos tempo os embriões sobrevivem (Figura 1). Os embriões que não desintegram dentro de 2 horas de cultura in vitro têm índices de sobrevivência idênticos in vitro e in vivo aos controles não-tratados.

20              Exemplo 2. Sobrevida de embriões de camundongo depois de usar diferentes perfis de descompressão

No presente experimento foi investigado se o índice de sobrevivência de embriões pressurizados pode ser melhorado por descompressão gradual.

25              Blastocistos expandidos foram mantidos a 90 MPa durante 30, 60 e 120 minutos, (onde o índice de sobrevivência em temperatura ambiente com descompressão instantânea foi de 50%, 0% e 0%, respectivamente) em seguida a pressão foi gradualmente liberada em 9 etapas durante 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Os resultados mostram que a sobrevivência pode ser significativamente aumentada por descompressão gradual, que tem um alcance  
30 ótimo dependendo do tempo que os embriões passam sob pressão. O tempo de nascimento ótimo aumentou quanto mais tempo os embriões passam

sob pressão. O índice de sobrevivência máximo, obtível por descompressão, foi reduzido à medida que o tempo da pressurização aumentou (Figura 2).

Na avaliação *in vitro* 54 embriões 'sobreviventes' e 35 embriões 'mortos' foram transferidos para 9 recipientes. Dos 54 embriões 'sobreviventes' 47 implantaram (87%), mas 0 embriões implantaram dos 35 embriões 'mortos' na contagem de 18 dias. O índice de implantação do grupo 'sobrevivente' não é diferente do índice de implantação dos controles ( $p < 0,05$ ).

Exemplo 3. Sobrevida de embriões de camundongo em diferentes pressões em baixa temperatura

10 Neste experimento foi investigado o papel da temperatura sobre a capacidade de sobrevivência dos embriões pressurizados.

Foram aplicados 30, 60 e 90 MPa de pressão aos embriões durante 1 segundo, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos em baixa temperatura (0 °C). Enquanto embriões não-pressurizados podem viver a 0 °C por uma quantidade de tempo substancial sem qualquer alteração significativa em sua sobrevivência, tratamento de pressão simultâneo com 30, 60, 90 MPa foi letal para 100 % dos embriões depois de 45, 10, 5 minutos, respectivamente. Foi observado um índice de sobrevivência significativamente reduzido com os embriões pressurizados em baixa temperatura comparados com os grupos tratados em temperatura ambiente ( $P < 0,01$ ) (Figuras 3a, 3b).

20 Na avaliação *in vitro* 40 embriões 'sobreviventes' e 28 embriões 'mortos' foram transferidos para 7 recipientes. Dos 40 embriões 'sobreviventes' 34 implantaram (85%), e 0 embriões implantaram dos 28 embriões 'mortos' na contagem de 18 dias. O índice de implantação do grupo 'sobreviventes' não é diferente do índice do controle ( $p < 0,05$ ).

Os embriões mantidos a 0 °C sob 90 MPa de pressão durante 30 minutos também foram descomprimidos gradualmente. Nenhum embrião sobreviveu em quaisquer dos tempos de recuperação que foram usados (30, 60, 90, 120, 150, 180 min). Oito a doze embriões foram usados em cada grupo, os experimentos foram repetidos por 3 vezes.

Exemplo 4. Sobrevida de embriões de camundongo depois de tratamento de pressão, congelamento e descongelamento

No presente estudo foi explorado se o índice de sobrevivência de blastocistos de camundongo expandidos criopreservados pode ser melhorado por tratamento de pressão antes do procedimento de congelamento. Os resultados são apresentados na tabela 1.

5 Tabela 1. Sobrevida de embriões congelados-descongelados criopreservados com/sem tratamento prévio de pressão

|                                | n   | Sinais de sobrevivência depois de 6 horas |                       | Sinais de sobrevivência depois de 20 horas |                |                       |                  |
|--------------------------------|-----|-------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------|----------------|-----------------------|------------------|
|                                |     | 1/2 expandidos                            | totalmente expandidos | 1/2 expandidos                             | 2/3 expandidos | totalmente expandidos | Eclodidos        |
| Grupo I                        | 115 | 9%                                        | 0% <sup>b</sup>       | 17%                                        | 10%            | 19%                   | 0% <sup>b</sup>  |
| Grupo II (tratado com pressão) | 95  | -                                         | 98% <sup>a</sup>      | -                                          | -              | 3%                    | 95% <sup>a</sup> |
| Controle não-tratado           | 107 | -                                         | 99% <sup>a</sup>      | -                                          | -              | 5%                    | 94% <sup>a</sup> |

Letras com diferentes sobrescritos são significativamente diferentes umas das outras ( $p < 0,01$ )

Foram observadas diferenças significativas no índice de sobrevivência entre os grupos pressurizados e não-pressurizados ( $p < 0,01$ ). A reexpansão foi mais rápida (4-6 horas vs. 20 horas) e o índice de sobrevivência foi maior (98% vs. 46%) nos embriões que receberam tratamento de pressão antes da criopreservação (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado por pressão no índice de sobrevivência e incubação.

Exemplo 5. Sobrevida de embriões bovinos depois de tratamento de pressão, congelamento e descongelamento

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta de Oócitos e Maturação In vitro (IVM)

Os produtos químicos foram adquiridos da EMBRAPA (Brasília, Brasil) a menos que indicado de outro modo. Os ovários foram colhidos de matadouro e mantidos em água fisiológica a 35-37 °C. Complexos cúmulus-

oócitos (COCs) foram obtidos por aspiração de folículos de 2-10 mm usando seringa de 20 ml com agulhas 18 G e foram colhidos em tubos de centrifuga de 50 ml. Depois de 10 minutos de sedimentação, os COCs foram aspirados para placas de Petri com TCM-199 de Hank (Gibco) suplementado com soro de feto de vitelo (FCS), penicilina, estreptomicina e heparina (Sigma H3149). Depois da coleta os COCs foram lavados três vezes no meio de maturação (TCM-199 de Earl suplementado com FCS, LH (Sigma), FSH (Sigma), L-Glutamina, penicilina e estreptomicina) e foram transferidos para 2 ml de meio de maturação (aproximadamente 100 COCs por placa de Petri), cobertas com óleo mineral. Os oócitos foram maturados em 38 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade máxima ao ar durante 22 horas.

#### Preparação do Esperma, Fertilização In vitro (IVF) e Cultura In vitro (IVC)

Para Fertilização In vitro, os COCs foram lavados três vezes em meio de fertilização antes de serem transferidos em grupos de 20-25 para placas de Petri contendo quatro gotas de 200µl, de meio de fertilização (TALP suplementado com BSA, penicilamina- Sigma P4875, hipotaurina- Sigma H1384, epinefrina- Sigma E4250 e heparina- Sigma H3149) coberto com óleo mineral. Espermatozóides dotados de motilidade foram obtidos por centrifugação de espermatozóides congelados-descongelados (Gentec, Cuiabá, Brasil) em um gradiente de densidade descontínua de Percoll (2 ml de Percoll a 45% sobre 2 ml de Percoll a 90%) durante 20 min a 700 g em temperatura ambiente. Péletes de espermatozóides, colhidos no fundo da fração de 90%, foram lavados em meio de Tyrode tamponado com HEPES e peletizados por centrifugação a 700 g durante 5 min.

Os espermatozóides foram contados em um hemocitômetro e diluídos no volume apropriado de TALP para dar uma concentração de  $2 \times 10^6$  de espermatozóides/ml ; uma alíquota de 200µl desta suspensão foi adicionada a cada gota de fertilização. As lâminas foram incubadas durante 19 horas em CO a 5% em ar umidificado a 39 °C. Zigotos prováveis foram em seguida cultivados in vitro em gotículas de SOF sob óleo mineral em uma atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5% a 39 °C.

### Pressurização

Blastocistos expandidos foram carregados em canudos plásticos de 0,25 ml sem bolhas de ar (7-9 embriões/canudo), com meio contendo embriões (Emcare Holding, Emcare, Nova Zelândia), em seguida os canu-  
 5 dos foram selados com PVC. Os canudos foram colocados na câmara de pressão preenchida com água como meio de pressão. Os embriões foram expostos a diferentes pressões hidrostáticas de 60 a 90 MPa (por incrementos de 10 MPa) por vários tempos (15, 30, 45, 50, 60, 90, 100 minutos), em temperatura ambiente, conforme detalhado acima.

### 10 Criopreservação com prévia pressurização

Os embriões foram alocados aleatoriamente em três grupos. Blastocistos do Grupo I foram criopreservados conforme mencionado abaixo, em uma solução de congelamento contendo 1,5 M de Etileno glicol (EG). Os embriões do Grupo II foram tratados com 80 MPa de pressão durante 50  
 15 min, então foram congelados do mesmo modo. O intervalo de tempo entre o início do congelamento e o tratamento de pressão foi entre 4 a 5 minutos. O Grupo III serviu como controle não-tratado. Depois do descongelamento, os embriões foram cultivados in vitro durante 24 horas.

### Criopreservação

20 Os blastocistos foram equilibrados durante 8 minutos em solução de congelamento consistindo em 1,5 M de etileno glicol (Emcare, Nova Zelândia) pré-carregado em um canudo plástico de 0,25 ml (7-9 embriões/canudo). Os canudos foram selados com PVC. Os canudos foram colocados em um freezer programável (Bio-cool, FTS-Systems, USA, NY) pré-resfriado até -5,2 °C. Depois de 3 min, foi induzida a semeadura. Depois de  
 25 um adicional de 10 min, os canudos foram resfriados a -0,5 °C/min até -32 °C, após o que foram mergulhados em nitrogênio líquido. Os canudos foram descongelados por 10 segundos de suave agitação em ar seguida por colocação do canudo em água a 35 °C até o gelo dentro do canudo fundir. Os  
 30 blastocistos foram recuperados dos canudos, lavados três vezes em SOF e foram movidos para SOF sob óleo mineral e retornados para o incubador durante 24 horas.

### Avaliação e análise estatística

A qualidade dos embriões foi examinada logo depois de liberar a pressão ou depois de descongelamento e depois de 2, 3, 4, 6, 12, e 24 horas. A sobrevida dos embriões foi avaliada pelo aspecto morfológico e desenvolvimento in vitro continuado: integridade dos blastocistos, re-expansão do blastocelo, e incubação da zona pelúcida foram os sinais de sobrevida. Blastocistos não-tratados foram usados como controles.

Os índices de sobrevida foram comparados com controle por teste qui-quadrado. O valor de probabilidade de  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

### RESULTADOS

Sobrevida e desenvolvimento continuado de embriões depois de vários tratamentos de pressão

Na primeira série de experimentos os embriões foram expostos a diferentes pressões hidrostáticas por vários tempos. Os resultados estão resumidos na tabela 2 abaixo: Tabela 2. Sobrevida de embriões bovinos congelados-descongelados criopreservados com/sem tratamento de pressão prévio

| Pressão  | Tempo  | n (compactado depois de des-compressão / não ~) | desenvolvimento continuado 6 h |        | desenvolvimento continuado 24 h (e-clodidos) |        |
|----------|--------|-------------------------------------------------|--------------------------------|--------|----------------------------------------------|--------|
|          |        |                                                 | I-II                           | III-IV | I-II                                         | III-IV |
| 80 MPa   | 45 min | 8 (5/3)                                         | 8                              | -      | 8 (4)                                        | -      |
| 60 MPa   | 60 min | 8 (3/5)                                         | 8                              | -      | 8 (5)                                        | -      |
| 90 MPa   | 45 min | 7 (7/0)                                         | 4                              | 3      | 4 (1)                                        | 3      |
| 90 MPa   | 30 min | 7 (3/4)                                         | 6                              | 1      | 6 (6)                                        | 1      |
| controle |        | 8                                               | 7                              | 1      | 6 (2)                                        | 2      |

I-II : embriões de primeira ou de segunda classe totalmente ou 2/3 reexpandidos; III-IV : embriões de terceira classe ou mortos

Desenvolvimento in vitro continuado de blastocistos vitrificados com e sem pré-tratamento de pressão

No segundo estudo foi explorado se o desenvolvimento in vitro

continuado de blastocistos bovinos criopreservados expandidos in vitro maturados/fertilizados/cultivados pode ser melhorado por tratamento de pressão antes do procedimento de congelamento. Foram usados 8-12 embriões em cada grupo experimental, os experimentos foram repetidos 6 vezes. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Foram observadas diferenças significativas no índice de sobrevivida in vitro entre os grupos pressurizados e não-pressurizados ( $p < 0,01$ ). A reexpansão foi mais rápida (1-2 horas vs. 4-6 horas) e o índice de sobrevivida foi maior (81% vs. 41%) nos embriões que receberam tratamento de pressão antes da criopreservação (tabela 3). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com pressão no índice de sobrevivida e de incubação.

Tabela 3. Desenvolvimento continuado in vitro de blastocistos bovinos IVMFC depois de descongelamento, congelados com ou sem pré-tratamento de pressão

|                               |    | 1 h   |     | 4 h   |     | 12 h       |       |     | 24 h       |       |     |
|-------------------------------|----|-------|-----|-------|-----|------------|-------|-----|------------|-------|-----|
|                               | n  | I+ II | IV  | I+ II | IV  | Eclo-didos | I+ II | IV  | Eclo-didos | I+ II | IV  |
| Congelados com pré-tratamento | 59 | 88%   | 12% | 81%   | 19% | 12%        | 81%   | 19% | 17%        | 81%   | 19% |
| Não tratados                  | 61 | 46%   | 54% | 41%   | 59% | 0%         | 41%   | 59% | 0%         | 41%   | 59% |

I-II : embriões de primeira ou de segunda classe totalmente ou 2/3 reexpandidos; IV: embriões mortos

#### Conclusões

Os resultados mostraram que o tratamento de pressão aplicado antes do congelamento pode melhorar os índices da velocidade de desenvolvimento in vitro, sobrevivida e incubação dos embriões bovinos IVMFC (maturação dos oócitos in vitro, fertilização in vitro, cultura de embriões in vitro). Este estudo proporciona evidência adicional de que um impulso de pressão pode acrescentar muito ao sucesso da criopreservação. Se reconhece que os métodos apresentados nos experimentos acima são facilmente adaptáveis a uma ampla faixa de material biológico, em particular embri-

ões de diferente origem, por exemplo, embriões eqüinos, caprinos, suínos ou de primatas, inclusive humanos.

Exemplo 6. Sobrevida do espermatozóide depois de tratamento de pressão, congelamento e descongelamento

5                Na primeira parte do presente estudo, pretendeu-se descrever como a alta pressão hidrostática afeta a proporção de células dotadas de motilidade do sêmen de touro fresco. Na segunda parte do experimento, 4 pares de parâmetros da planilha de pressão-tempo-motilidade do espermatozóide colhido foram escolhidos, e comparou-se a motilidade pós-  
10 descongelamento do sêmen de touro congelado pré-tratado com os parâmetros de pressão-tempo escolhidos com os sêmens que foram congelados sem pré-tratamento.

              As amostras de sêmen foram obtidas do Centro de Inseminação Artificial de Klessheim, na Áustria. A amostra foi diluída para uma concentra-  
15 ção de espermatozóides de  $8 \times 10^7$ /ml com extensor AndroMed (MiniTub, Alemanha) conforme descrito na prescrição. O esperma diluído foi carregado em canudos de 0,25 ml e mantido em temperatura ambiente. Antes do tratamento de pressão, o canudinho com a amostra de sêmen foi cortado em duas partes. Metade foi vedada termicamente e em seguida pressurizada  
20 com um parâmetro pressão/tempo específico, a outra metade foi usada para comparar a motilidade pós-pressão. Os experimentos em cada parâmetro pressão/tempo específico foram repetidos por sete vezes, a motilidade progressiva foi avaliada individualmente por investigação por microscopia ótica por dois assistentes separados. Os grupos de tratamento foram estimulados  
25 com os seguintes parâmetros: 10 MPa durante 30, 60, 90 e 120 min; 30 MPa durante 30, 60, 90, 120 e 510 min; 50 MPa durante 30, 60 e 90 min; 70 MPa durante 30, 60 e 90 min; 90 MPa durante 30, 60, 90, 120 e 510 min. O dispositivo de pressurização foi feito customizado de aço inoxidável, compreendendo uma câmara de pressão com água como um meio de pressão, e um  
30 calibre de pressão aprovado pelas autoridades. O tempo para atingir a quantidade desejada de pressão foi entre um a cinco minutos, a despressurização tomou entre dois a três segundos.

A motilidade média das amostras controle variou entre 75 a 90 por cento, enquanto a motilidade média das amostras pressurizadas variou entre 55 (90 MPa/120 min) a 84 (10 MPa/30 min) por cento. Os grupos de 30 MPa/510 min e 90 MPa/510 min tiveram motilidade significativamente redu-  
 5 zida comparados com os outros grupos pressurizados (27% e 33%, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Veja a figura 4.

Na segunda parte do experimento as amostras de sêmen foram obtidas de dois touros (um com um histórico de congelabilidade muito pobre). As amostras diluídas como acima, em seguida foram divididas em qua-  
 10 tro grupos de tratamento. Os grupos de tratamento foram divididos: metade foi vedada termicamente e pressurizada com I : 90 MPa/30 min; II : 90 MPa/90 min; III : 30 MPa/30 min; IV: 30 MPa/90 min antes do congelamento, a outra metade foi congelada sem pré-tratamento com o mesmo protocolo de congelamento (60 min de equilibração a 5 °C, em seguida 10 minutos a -  
 15 110 °C antes de mergulhar em nitrogênio líquido). O descongelamento foi realizado em banho-maria a 35 °C durante 30 segundos. Cada grupo também foi testado para motilidade inicial com e sem pressurização. Cada experimento foi repetido por oito vezes.

A motilidade inicial média de ambos os touros foi entre 65 e 80  
 20 por cento, enquanto depois da pressurização foi reduzida para entre 45 a 75 por cento. A motilidade pós-descongelamento média de ambos os touros foi significativamente superior com pré- tratamento de pressão comparada com as amostras congeladas sem pressurização prévia ( $p < 0,001$ ) (Touro 1 : 2-3% sem pressurização vs. 17-33% com pressurização - figura 5; Touro II:  
 25 0% sem pressurização vs. 21-35% com pré-tratamento de pressão - figura 6).

Entre os parâmetros usados, 30 MPa/90 min se comprovou significativamente superior (33 e 35 %;  $p < 0,05$ ).

O presente estudo descreve claramente o efeito benéfico de um  
 30 tratamento de pressão prévio para a motilidade pós-descongelamento de sêmen de touro criopreservado em nosso experimento. Este estudo proporciona evidência adicional de que um impulso de pressão pode acrescentar

5 muito ao sucesso da criopreservação. Se reconhece que os métodos apresentados nos experimentos acima são facilmente adaptáveis a uma ampla faixa de material biológico, em particular espermatozóides de diferente origem, por exemplo, de origem eqüina, caprina, suína ou de primatas, inclusive de origem humana.

#### Aplicabilidade Industrial

Os resultados apresentados nos exemplos acima mostram que o tratamento de pressão aplicado antes da criopreservação obviamente melhora os índices da velocidade de desenvolvimento, sobrevivência e incubação dos embriões in vitro. Conseqüentemente, pode ser obtido o objetivo final de todo o esforço referido: produção de mais prole. Além disso, os dados apresentados sobre embriões bovinos e espermatozóide de touro indicam a ampla aplicabilidade do conceito da invenção para a criopreservação de materiais biológicos. A aplicação do método de acordo com a presente invenção pode ser útil para aumentar as taxas de sucesso em todos os tipos de criopreservação de embriões e manipulação de embriões, inclusive outras espécies mamíferas, seres humanos não-excluídos, bem como a aplicação de oócitos, células-tronco embrionárias, tecidos e semelhantes. O presente método também abre amplas possibilidades para outros campos onde a criopreservação de material biológico pode encontrar suas aplicações.

#### Referências

- Abe, F., and Horikoshi, K. (1995). Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 130, 307-312.
- 25 Abe, F., and Horikoshi, K. (1997). Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H<sup>+</sup>-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 baro- (piezo-) physiology. *Extremophiles* 2, 223-228.
- 30 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.
- Archer, J., Gook, D. A., Edgar, D. H. (2003). Blastocyst formation  
 5 and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture. *Human Reproduction* (Oxford, England) 18, 1669-1673.
- Baguisi, A., Arav, A., Crosby, T. F., Roche, J. F., and Boland, M. P. (1997). Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 48, 1017-1024.
- 10 Bridgman, P. W. (1911). Water in the liquid and five solid forms under pressure. *Proceedings of the American Academy of Arts and Science* 47, 441-558.
- Bridgeman, P. E. (1970). The physics of high pressure. New York: Dover
- 15 Butz P, Ludwig H. (1986). Pressure inactivation of microorganisms at moderate temperatures. *Physica B+C* 139-140,875-877.
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A. and Meryman, H. T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21.407-426.
- 20 Fukuda, A., Osawa, T., Oda, H., Tanaka, T., Toyokuni, S. and Uchida, K. Oxidative stress response in iron induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 76-81.
- Garcia-Gardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G.,  
 25 Papapetropoulos. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by HSP90. *Nature* 1998; 392: 821-4.
- 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.
- 30 Gross, M., 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.

Huang, S. Y., Kuo, Y. H., Lee, W. C., Tsou, H. L., Lee, Y. P.,  
Chang, H. L. et al.

Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm  
5 motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 1007-  
16.

Huang, S. Y., Kuo, Y. H., Tsou, H. L., Lee, W. C., King, Y. T.,  
Huang, H. C. et al. The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a  
specific inhibitor of heat shock protein 90 (HSP90). *Theriogenology* 2000; 53:  
10 1117-84.

Ishwar, A. K., Memon, M. A. (1996). Embryo transfer in sheep  
and goats: a review.

*Small Ruminant Research* 19, 35-43.

Jaenicke, R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to  
15 extreme conditions. *Eur J Biochem* 202,715-728.

LaTena, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C. L.,  
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*  
20 *SciUSA*88, 10907-10911.

Leibo, S. P. and Songsasen, N. (2002). Cryopreservation of ga-  
mets and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57.303-326.

Macdonald, A. G. (1987). The role of membrane fluidity in com-  
plex processes under high pressure. In: Jonnasch, H. W., Marquis, R. E.,  
25 Zimmerman, A. M., editors.  
Current Perspectives in High Pressure Biology. London: Academic Press pp.  
207-223.

Medeiro, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., and Rodrigues,  
2002. J. L. Current Status Of Sperm Cryopreservation: Why Isn't It Better?  
30 *Theriogenology* 57: 327-344.

Murakami, T. H., Zimmerman, A. M. (1973). DNA synthesiseis in  
*Tetrahymena*: a pressure study. *Cytobios* 7,171-181.

- Nowshari, M. A., Brem, G. (1998). Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure. *Theriogenology* 50,1001-1013.
- 5 Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welti-Chanes, J., and Swanson, B. G. (1997). Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensm. -Wiss. U. Technol.* 30,703-708.
- Pearl, L. H. and Prodromou, C. Structure and in vivo function of
- 10 Hsp 90. *Curr. Opin Struct Biol* 2000 ; 10: 46-51.
- Péqueux, A., and Gilles, R. (1978). Effects of high hydrostatic pressures on the activity of the membrane ATPases of some organs implicated in hydromineral regulation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 59, 207-212.
- 15 Phadtare, S., Alasina, J., Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* 2,175-180.
- Phadtare S., Alasina J. and Inouye M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* 2,175-180 Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1999).
- 20 Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 171.135-138.
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brian, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H.
- Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in
- 25 the HSP90 molecular chaperone. *Cell* 1997; 90: 65-75.
- Rall, W. F., and Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at- 196 °C by vitrification. *Nature* 313,573-575.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Vajta, G., and Trounson, A. O. (2001). Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the
- 30 open pulled straw vitrification method. *Human Reproduction* 16,2187-2194.
- Routray, P., Suzuki, T., Strüssmann, C. A. and Takai, R. (2002). Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka,

*Oryzias latipes*. *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.

Seki, K., Toyoshima, M. (1998). Preserving tardigrades under pressure. *Nature* 395, 853-854.

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.

Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high- pressure. *The Journal of Supercritical Fluids* 22,55-63.

Stachecki, J, J., Cohen, J., Schimmel, T., Willadsen, S. M. (2002). Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. *Cryobiology* 44, 5-13.

Takahashi, T., Kakita, A., Takahashi, Y., Sakamoto, I., Yokoyama, K., Fujiu, T., Yamashina, S., Tamaki, T., Takazawa, Y., Muratsubaki, R. (2000). Functional integrity of the rat liver after abaxio de zero preservation under high pressure. *Transplantation Proceedings* 32, 1634-1636.

Takahashi, T., Kakita, A., Takahashi, Y., Yokoyama, K., Sakamoto, I., Yamashina, S. (2001). Preservation of rat livers by supercooling under high pressure. *Transplantation Proceedings* 3, 916-919.

Van Wagtendonk-De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H., Kruip, T. A., Rall, W. F. (1995).

Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology* 32,157-167.

Van Wagtendonk-De Leeuw, A. M., Den Haas, J. H. G., and Rall, W. F. 1997. Field trials to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vit- rification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 48, 1071-1084.

- Watson, P. F. The effect of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G. J. and Clarke, A. eds. Effects of low temperature on biological membranes. London: Academic Press; 1981. p. 189-218.
- Weber, G., Drickamer, H. G. (1983). The effect of high pressure  
 5 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.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Karatzas, A. K., Wouters, J. A.,  
 10 Abee, T. (2002). Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* L028 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. Appl Environ Microbiol 68, 456-63.
- Wen-Lei, C., Yi-Xin, W., Zu-Qiong, X. and Zheng, L. (2003). Cryopreservation- induced decrease in heat-shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism. Asian Journal Of Andrology 5. 43-46.
- 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.  
 20
- Yager, P., Chang, E. L. (1983). Destabilization of a lipid non-bilayer phase by high pressure. Biochim Biophys Acta 731, 491-494.
- Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. Mol Microbiol 27, 247-255.  
 25

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a sobrevivência pós-descongelamento de material biológico viável criopreservado compreendendo

5 (a) aplicar pressão hidrostática ao referido material biológico viável, opcionalmente de acordo com um perfil de pressão-tempo predeterminado;

(b) manter o referido material biológico viável na pressão hidrostática por um período de tempo predeterminado;

(c) liberar a pressão hidrostática;

10 (d) congelar o referido material biológico viável usando qualquer protocolo aplicável ao mesmo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a referida pressão hidrostática está dentro do alcance de 1 a 200 MPa, preferencialmente 10 a 100 MPa, mais preferencialmente 20 a 75 MPa, e ainda mais preferencialmente 30 a 60 MPa.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que a referida pressão hidrostática é aplicada por um período de tempo de 1 segundo e 300 minutos, preferencialmente 1 segundo a 150 minutos, mais preferencialmente 1 segundo a 90 minutos, e ainda mais preferencialmente 1 segundo a 60 minutos.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em que a pressão é liberada gradualmente durante um período de tempo de 1 segundo a 4 horas ou instantaneamente.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 em que o referido material biológico viável é selecionado entre o grupo consistindo em óócitos, espermatozoides, zigotos, mórulas, blastocistos, células-tronco, células ou tecidos de um animal vertebrado.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 em que o referido animal vertebrado é um peixe, uma ave ou um mamífero, preferencialmente bovino, equino, caprino, ovino, suíno, outras criações, animais de estimação, primatas, inclusive humanos.

7. Uso de um dispositivo de pressurização para criopreservação

de acordo com qualquer uma das reivindicação 1 a 6.

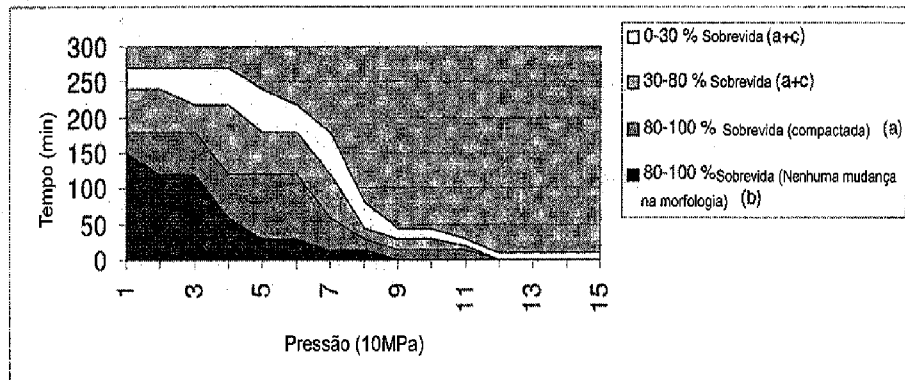
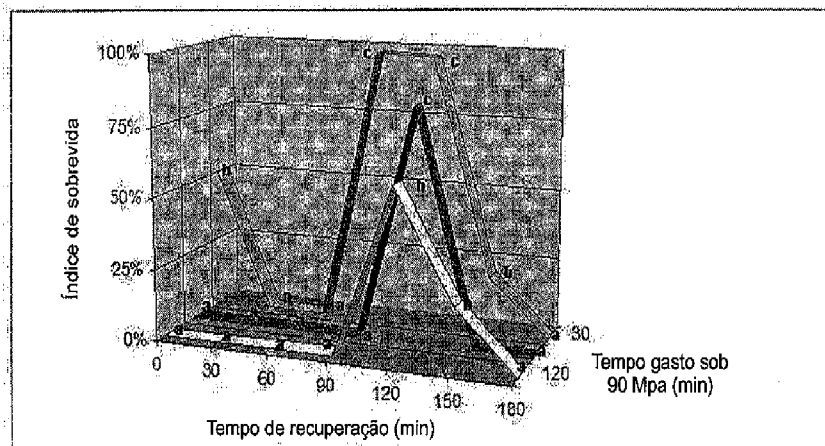
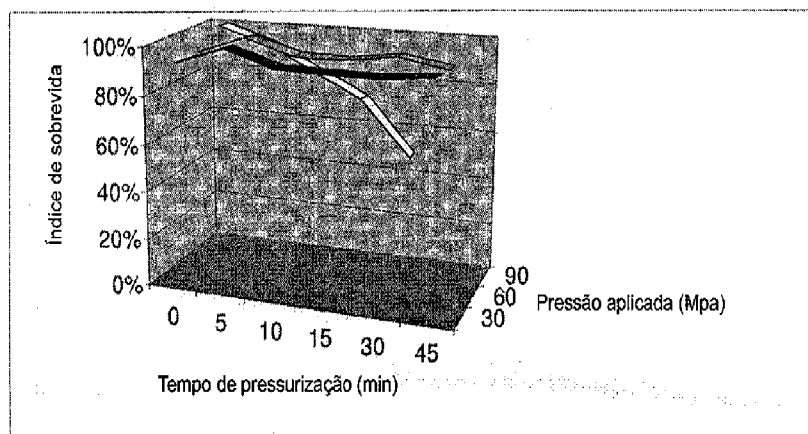
8. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que o dispositivo de pressurização inclui uma câmara de pressão adequada para receber o material biológico, e meios para proporcionar pressão controlada dentro do alcance de 1 a 200 MPa, preferencialmente 10 a 100 MPa, mais preferencialmente 20 a 75 MPa, e ainda mais preferencialmente 30 a 60 MPa,

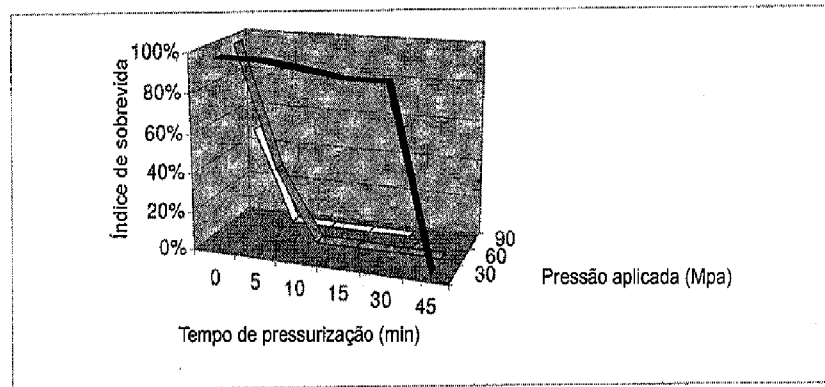
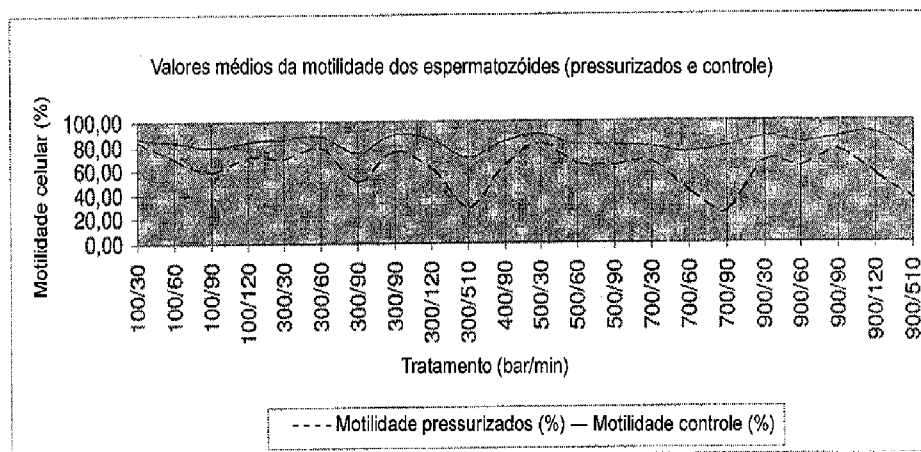
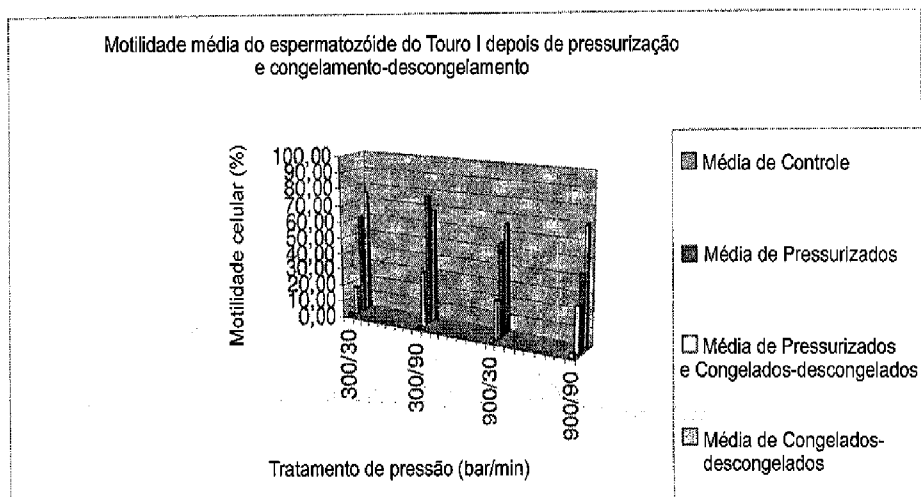
9. Uso de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que o dispositivo de pressurização compreende meios para manter a referida pressão por um período de tempo de 1 segundo a 300 minutos, preferencialmente 1 segundo a 150 minutos, mais preferencialmente 1 segundo a 90 minutos, e ainda mais preferencialmente 1 segundo a 60 minutos.

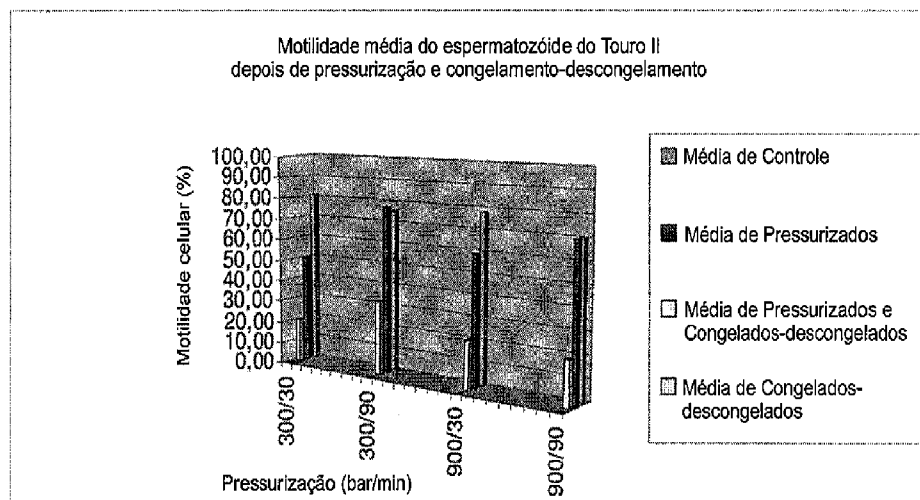
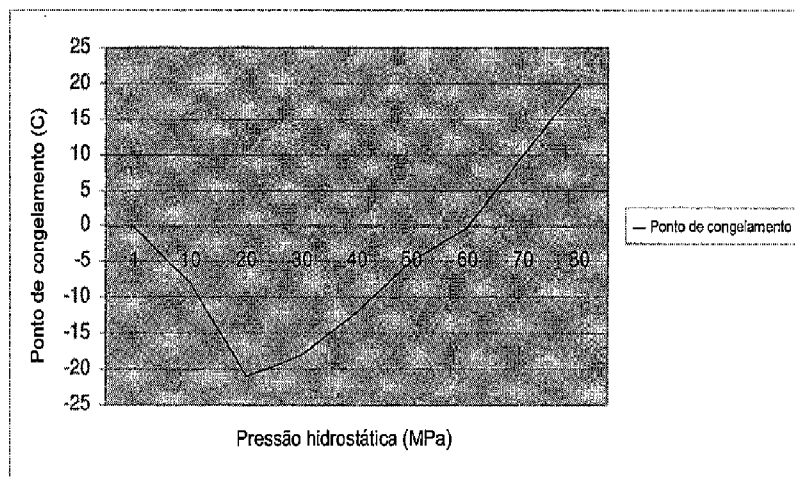
10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, em que é proporcionado um sistema controle para controlar a despressurização da câmara de pressão durante um período de tempo de 1 segundo a 4 horas ou instantaneamente.

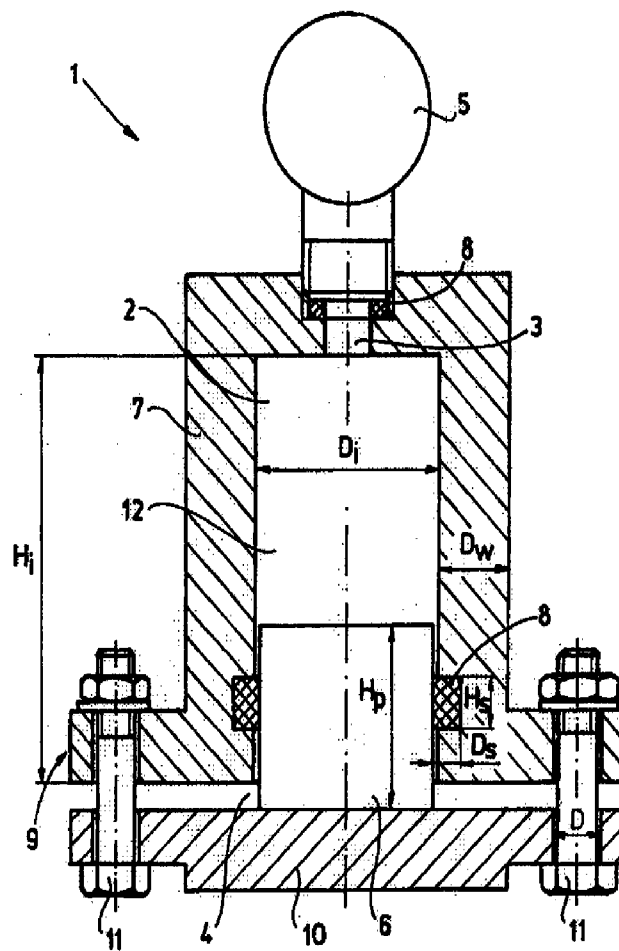
11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, em que está sendo obtida pressão hidrostática dentro do dispositivo de pressurização.

12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, em que o referido material biológico viável é selecionado entre o grupo consistindo em oócitos, espermatozóides, zigotos, mórulas, blastocistos, células-tronco, células ou tecidos de um animal vertebrado.

**Fig.1****Fig.2****Fig.3a**

**Fig.3b****Fig.4****Fig.5**

**Fig.6****Fig.7**

**Fig.8**