



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

(21) PI 1106685-7 A2

(22) Data do Depósito: 26/10/2011

(43) Data da Publicação: 27/02/2018



(54) Título: TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM SUPORTE METÁLICO

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

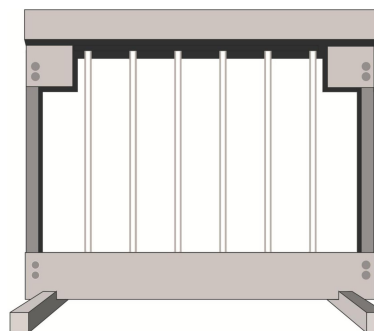
(52) CPC: A01N 1/0268,A01N 1/0221,A01N 1/0226

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

(72) Inventor(es): TIAGO VEIRAS COLLARES; JOÃO CARLOS DESCHAMPS; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON; VINICIUS FARIAS CAMPOS; FABIANA KÖMMLING SEIXAS; JOÃO CARLOS DESCHAMPS

(74) Procurador(es): SILVA TRISCH DOS SANTOS ACUNHA

(57) Resumo: TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM SUPORTE METÁLICO. A presente invenção refere-se a criopreservação de oócitos de mamíferos utilizando suporte metálico, e mais particularmente refere-se a estrutura metálica criada para vitrificação, servindo esta como suporte para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos em palhetas; e a adição de copolímero bloqueador de gelo às solução crioprotetoras de vitrificação. Existe no estado da técnica uma carência no método de acondicionamento das microgotas vitrificadas contendo os oócitos, e além disso, a principal causa de crioinjúrias celulares é a formação de gelo intra e extra celular. Em vista disto, a presente invenção abrange um suporte metálico, que facilita a manipulação das microgotas vitrificadas contendo os oócitos, poi permite o armazenamento em palhetas de 0,5 mL; e a adição de copolímero bloqueador de gelo nas soluções de vitrificação, a fim de diminuir as crioinjúrias causadas às células. A presente invenção refere-se à metodologia de criopreservação ultrarrápida, ao qual foi elaborada para ser utilizada em laboratórios de biotécnicas reprodutivas especializados.



Relatório Descritivo

"TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM SUPORTE METÁLICO"CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a criopreservação de oócitos mamíferos utilizando suporte metálico, e mais particularmente refere-se a metodologia e a estrutura metálica criada para vitrificação, servindo como suporte para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos.

[002] Mais especificamente, a presente invenção refere-se à composição das soluções crioprotetoras, com a adição de bloqueadores de gelo a solução crioprotetora; à estrutura metálica utilizada na vitrificação; ao protocolo utilizado na crioproteção e à vitrificação dos oócitos. Permitindo assim a criopreservação de gametas femininos de forma prática, rápida e eficiente. Esta metodologia de criopreservação ultrarrápida foi elaborada para ser utilizada em laboratórios de técnicas reprodutivas especializados. Pois, um protocolo seguro de criopreservação, além de conservar o material genético de reprodutoras de alto desempenho e de interesse zotécnico, permite a formação de banco genético, a preservação de

espécies e utilização em biotecnologias de reprodução assistida.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Criopreservação.

[003] A criopreservação é um processo onde células ou tecidos biológicos são preservados através de temperaturas muito baixas, geralmente -196°C . Por meio deste processo se consegue a suspensão do metabolismo celular e a manutenção das características biológicas por um longo período de tempo, mantendo a viabilidade celular.

[004] O processo de criopreservação pode ser classificados de acordo a taxa de resfriamento utilizada. O congelamento lento atinge uma taxa de resfriamento entre $0,5^{\circ}\text{C}$ a $1,6^{\circ}\text{C}$, esta metodologia requer em torno de 4 horas de processo, e foi largamente utilizado na criopreservação de embriões e oócitos. O congelamento rápido atinge taxa de resfriamento de 17°C a 30°C , este processo deve levar em torno de 2 horas de duração. Enquanto que, o congelamento ultra rápido pode atingir taxas de 20.000°C a 25.000°C , onde todo o processo leva em média 3 minutos, sendo este o método de congelamento mais utilizado atualmente para oócitos mamíferos. A taxa de resfriamento e o método de congelamento são importantes fatores a serem considerados na prevenção crioinjúrias.

Criopreservação de oócitos.

[005] A criopreservação de oócitos é realizada em muitas espécies de mamíferos incluindo humanos, camundongos, bovinos, bubalinos, suínos e equinos. No entanto, oócitos são extremamente sensíveis ao congelamento, pois são células grandes, com uma baixa relação entre superfície e volume, e ainda são rodeados por uma zona pelúcida, dificultando a desidratação e a permeabilidade de membrana aos crioprotetores.

[006] Oócitos no estágio imaturo, de vesícula germinativa, são menos propensos a danos cromossômicos e microtubulares durante a criopreservação. Porém, oócitos maduros, em metáfase II, também podem ser criopreservados. A vitrificação é o método de criopreservação que está ganhando notoriedade devido a melhores taxas de sucesso na criopreservação de oócitos imaturos e maduros.

[007] A criopreservação de oócitos, além de conservar o material genético de fêmeas reprodutoras de alto padrão genético, permite a formação de banco genético, a preservação de espécies em extinção e a utilização da criopreservação em biotecnologias de reprodução assistida.

Vitrificação.

[008] A vitrificação envolve rápidas taxas de resfriamento e aquecimento em presença de concentrações altas de crioprotetores, evitando assim, a formação de cristais de gelo intracelular e extracelular, e diminuindo as crioinjúrias causadas as células. O presente método surgiu como alternativa aos métodos de congelamento lento e rápido, a fim de obter resultados mais satisfatórios de sobrevivência de oócitos e embriões.

[009] A vitrificação é uma técnica de criopreservação promissora na reprodução assistida, sendo um procedimento simples, menos oneroso, e que requer um menor tempo despendido. Durante os últimos anos, diversas técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas, com isso, inúmeros agentes crioprotetores vêm sendo utilizados em diferentes concentrações e combinações, com o objetivo de minimizar os danos causados as células.

Vitrificação em Superfície Sólida.

[010] O método de vitrificação em superfície sólida, denominado de *Solid Surface Vitrification* (SSV), foi desenvolvido com o objetivo de aumentar a taxa de resfriamento durante a vitrificação. Este método é aplicado sobre uma superfície de metal, pré-congelada por imersão parcial em nitrogênio líquido, onde são

colocadas as microgotas de solução de vitrificação contendo os oócitos ou embriões, que vitrificam ao imediato contato com a superfície de metal. Este método foi aplicado em oócitos bovinos, caprinos, suínos e equinos.

[011] A estrutura de metal descrita em patente depositada, US006982172B2 de 3 de janeiro de 2006, não prevê o armazenamento das microgotas vitrificadas. Sendo utilizado criotubos para o armazenamento das microgotas em nitrogênio líquido. Este tipo de armazenamento, além de dificultar a manipulação na armazenagem e no descongelamento, acarreta a perda de algumas microgotas contendo oócitos/embriões durante o processo de vitrificação e desvitrificação.

Soluções Crioprotetoras e bloqueadores de gelo.

[012] Para execução da criopreservação e manutenção da integridade celular é necessário a preparação celular com substâncias crioprotetoras. Apesar da breve exposição dos oócitos aos crioprotetores durante o processo de vitrificação, suas altas concentrações podem causar danos às células devido a sua toxicidade química e estresse osmótico. Macromoléculas, como açúcares, soro fetal bovino (SFB) e polímeros sintéticos, reduzem a toxicidade de soluções crioprotetoras.

[013] Os polímeros são materiais que apresentam em sua estrutura molecular unidades relativamente simples que se repetem, formando longas cadeias, resultando em compostos de alta massa molecular.

[014] O Supercool X-1000™ (21st Century Medicine, Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA), é um bloqueador sintético da formação de gelo que foi utilizado na invenção patentiada por Fahy, G. & Wowk, B. US20070190517A1 em 16 de agosto de 2007, para a criopreservação de órgãos. Este bloqueador de gelo é um copolímero de polivinil álcool (PVA) com 20% vinil acetato, que, quando adicionado em baixa concentração nas soluções de vitrificação, suprime a formação de cristais de gelo e se liga a membrana celular, protegendo as células e aumentando a taxa de sobrevivência após a desvitrificação. O Supercool X-1000™ foi adicionado as soluções de vitrificação para criopreservar oócitos e embriões de camundongos.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[015] A presente invenção tem como objetivo principal executar a vitrificação de oócitos de mamíferos através de superfície de metal, criada para a manipulação durante a vitrificação e armazenagem dos oócitos vitrificados, permitindo o acondicionamento destes em palhetas.

Adicionalmente, a presente invenção abrange a adição de copolímero bloqueador de gelo nas soluções de vitrificação, a fim de aumentar a viabilidade dos oócitos pós-criopreservação.

[016] Existe no estado da técnica uma carência no método de acondicionamento das microgotas vitrificadas contendo os oócitos, pois o armazenamento tradicional utiliza microtubos. Além disso, a principal causa de crioinjúrias celulares é a formação de gelo intra e extra celular, causando principalmente danos de membrana. Para preencher tal carênciaa presente invenção mostra uma estrutura de metal que deverá ser utilizada na manipulação e armazenagem no processo de vitrificação de oócitos. E ainda a presente invenção adiciona copolímero bloqueador de gelo as soluções de vitrificação.

[017] Em vista do exposto, tem a presente invenção o objetivo de provera criopreservação de oócitos de mamíferos, facilitando o processo e tornando os resultados de viabilidade mais satisfatórios.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção refere-se a criopreservação de oócitos de mamíferos utilizando um suporte metálico e bloqueador de gelo nas soluções crioprotetoras.

[019] Mais especificamente, a presente invenção refere-se à composição das soluções crioprotetoras, com a adição de copolímero bloqueador de gelo as soluções de vitrificação, a fim de obter uma menor taxa de crioinjúrias causadas aos oócitos. Mais particularmente, a presente invenção refere-se à estrutura metálica que deverá ser utilizada na manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos durante a vitrificação.

Soluções de Vitrificação Crioprotetoras

[020] A solução crioprotetora de vitrificação 1 (SV1) deverá ser composta por 400µl de Etilienoglicol, 2ml de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) e 7,55mL de Meio de Cultivo de tecidos 199 (TCM-199), 0,1% do copolímero bloqueador de gelo Supercool X-1000™ (21st Century Medicine, Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA), para um total de 10 mL de SV1.

[021] A solução crioprotetora de vitrificação 2 (SV2) deverá ser composta de 3,5mL de Etilienoglicol, 2mL de SFB inativado, 0,5g de Polivinilpirrolidona (PVP), 1,37g de Sacarose, 7,09mL de TCM-199, 0,1% do copolímero bloqueador de gelo Supercool X-1000™, para um total de 10 mL de SV2.

Suporte Metálico

[022] A estrutura metálica deverá ser construída a partir de chapas de alumínio, com a finalidade de ser utilizada para a vitrificação em superfície sólida de oócitos mamíferos. A estrutura finalizada deverá medir 16,4 cm de comprimento, 20 cm de largura, 13 cm de altura e 4,5 cm de profundidade. Esta estrutura contém poros com 3 mm de diâmetro que permitem a instalação de seis palhetas francesas de 0,5 mL. Para execução da vitrificação utilizando a presente invenção descrita, o suporte metálico deverá ser colocado em caixa térmica e ainda submerso em nitrogênio líquido. Quando submersa em nitrogênio líquido a estrutura de alumínio atinge de -176°C a -180°C . A Figura 1 ilustra a estrutura metálica utilizada para a vitrificação de oócitos mamíferos.

[023] As microgotas vitrificadas deverão ser armazenados nas palhetas com auxílio de pinça previamente congelada no nitrogênio líquido. A Figura 2 ilustra a microgota vitrificada contendo os oócitos, que deverá ser armazenada nas palhetas encaixadas na estrutura metálica. Após o processo de vitrificação, as palhetas deverão ser desencaixadas e em seguida seladas para o armazenamento em nitrogênio líquido.

Vitrificação de Oócitos em Suporte Metálico

[024] Para execução do protocolo de vitrificação proposto na presente invenção, os oócitos deverão ser previamente coletados e selecionados para a criopreservação. Os oócitos em estágio imaturo e maturo poderão ser utilizados nesta metodologia proposta, assim como deverão estar com as células do cumulus (coroa radiada) ao seu redor. Além disso, de forma prévia a execução da criopreservação, as soluções de vitrificação deverão ser confeccionadas com antecedência e deverão estar aquecidas a 37°C no momento de início da vitrificação.

[025] Para início do protocolo de vitrificação, o grupo de oócitos que serão criopreservados deverão ser colocados na solução de vitrificação crioprotetora 1, em uma gota de 100 µL de SV1 (descrita no item Soluções de Vitrificação Crioprotetoras). Estes oócitos deverão permanecer na SV1 durante 10 a 15 minutos em placa aquecedora a 37°C. Em seguida, os oócitos, em grupo de 3 a 4 oócitos, deverão ser transferidos, em um volume máximo de 10µL, para a solução de vitrificação crioprotetora 2. Deverão ser preparadas 3 gotas da SV2 (descrita no item Soluções de Vitrificação Crioprotetoras) de 60 µL cada para que os oócitos, em grupo de 3 a 4, sejam passados em três tempos de 30 segundos cada nestas três gotas de SV2. Estas passagens em SV2 deverão ser finalizadas em uma microgota

de 3 μ L de SV2 contendo os oócitos, coletada com auxílio de micropipeta e ponteira de até 10 μ L, a microgota deverá ser colocada diretamente na estrutura de alumínio (descrita no item Suporte Metálico), que estará dentro de caixa térmica e submersa em nitrogênio líquido. As microgotas vitrificadas deverão ser colocadas nas palhetas encaixadas na estrutura, isto deverá ser realizado com auxílio de pinça previamente congelada em nitrogênio líquido, empurrando as microgotas através dos poros da estrutura metálica e desta forma os oócitos são armazenados em palhetas. Após término do processo de vitrificação, as palhetas deverão ser desencaixadas do suporte metálico com auxílio de pinça e seladas com material atóxico, para armazenamento em raques no interior de botijões de nitrogênio líquido.

Desvitrificação de Oócitos

[026] Para a desvitrificação dos oócitos mamíferos, deverá ser preparada previamente uma solução de trealose a 0,3 M. No momento da desvitrificação esta solução deverá estar a 37°C para o reaquecimento dos oócitos vitrificados. As palhetas deverão ser retiradas das raques ainda submersas em nitrogênio líquido, em seguida uma das extremidades da palheta deverá ser cortada e esta

extremidade deverá ser voltada rapidamente para uma gota de 500 µL da solução de trealose 0,3 M. As microgotas vitrificadas deverão cair na solução de trealose aquecida, permanecendo a 37°C durante 3 minutos. Após este período, osócitos vitrificados/desvitrificados deverão ser lavados em três gotas de 60 µL cada de TCM-199 adicionado de 10% de SFB inativado, aquecido a 37°C, para a completa remoção das soluções crioprotetoras.

Lista de Abreviaturas

[027] SSV: *Solid Surface Vitrification* - Vitrificação em Superfície Sólida

SFB: Soro Fetal Bovino

PVA: Polivinil Álcool

SV1: Solução Crioprotetora de Vitricificação 1

SV2: Solução Crioprotetora de Vitricificação 2

TCM-199: Meio de Cultivo de Tecidos 199

PVP: Polivinilpirrolidona

EXEMPLOS

[028] Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados exemplos de possíveis variações na criopreservação de oócitos mamíferos

por vitrificação utilizando suporte metálico.

EXEMPLOS

-Vitrificação utilizando suporte metálico.

[029] De acordo com as potenciais aplicações da presente invenção e de forma somente ilustrativa, sem a intenção de limitar em qualquer circunstância a abrangência da presente invenção, é descrita a seguir uma das possíveis formas de criopreservação de oócitos e embriões mamíferos por vitrificação utilizando suporte metálico:

EXEMPLO 1

- Criopreservação de oócitos por vitrificação em suporte metálico utilizando a adição de copolímero bloqueador de gelo às soluções crioprotetoras de vitrificação.

[030] Soluções de vitrificação:A solução crioprotetora de vitrificação 1 (SV1) deverá ser composta por:400µL de Etilienoglicol, 2mL de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) e 7,55mL de Meio de Cultivo de tecidos 199 (TCM-199) e0,1% do copolímero bloqueador de gelo Supercool X-1000™. A solução crioprotetora de vitrificação 2 (SV2) deverá ser composta por: 3,5 ml de Etilienoglicol, 2ml de SFB inativado, 0,5g de Polivinilpirrolidona (PVP), 1,37g de Sacarose, 7,09ml de TCM-199 e 0,1% do copolímero bloqueador de gelo Supercool X-1000™.

[031] Vitrificação: Para a criopreservação de oócitos em estágio imaturo e maturo com a presença das células do *cumulus*. As soluções SV1 e SV2, adicionados de 0,1% do copolímero bloqueador de gelo, deverão estar aquecidas a 37°C. Os oócitos deverão ser colocados em gota de 100 µL de SV1, permanecendo de 10 a 15 minutos a 37°C. Em seguida, grupos de 3 a 4 oócitos deverão ser transferidos para SV2, em três gotas de 60 µL cada, permanecendo três tempos de 30 segundos. Este período deverá ser finalizado em microgota de 3 µL de SV2 contendo os oócitos, que será depositada diretamente no suporte metálico submerso em nitrogênio líquido. Logo após, as microgotas vitrificadas deverão ser colocadas nas palhetas encaixadas na estrutura, que serão desencaixadas do suporte e seladas, e desta forma os oócitos são armazenados em palhetas.

[032] Desvitrificação: uma extremidade da palheta deverá ser cortada ainda em submersão no nitrogênio líquido, e na sequência em seguida esta extremidade deverá ser voltada rapidamente para uma gota de 500 µL da solução de trealose 0,3 M aquecida a 37°C para que as microgotas caiam nesta solução, permanecendo durante 3 minutos. Após este período, os oócitos vitrificados/desvitrificados deverão ser lavados em três gotas de 60 µL cada de TCM-199 adicionado de 10% de SFB inativado.

EXEMPLO 2**- Criopreservação de oócitos por vitrificação em suporte metálico.**

[033] Soluções de vitrificação: A solução crioprotetora de vitrificação 1 (SV1) deverá ser composta por: 400µL de Etilienoglicol, 2mL de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) e 7,6mL de Meio de Cultivo de tecidos 199 (TCM-199). A solução crioprotetora de vitrificação 2 (SV2) deverá ser composta por: 3,5 mL de Etilienoglicol, 2mL de SFB inativado, 0,5 g de Polivinilpirrolidona (PVP), 1,37g de Sacarose, 7mL de TCM-199 e 0,1% do copolímero bloqueador de gelo Supercool X-1000™.

[034] Vitrificação: Para a criopreservação de oócitos em estágio imaturo e maturo com a presença das células do *cumulus*. As soluções SV1 e SV2 deverão estar aquecidas a 37°C. Os oócitos deverão ser colocados em gota de 100 µL de SV1, permanecendo de 10 a 15 minutos a 37°C. Em seguida, grupos de 3 a 4 oócitos deverão ser transferidos para SV2, em três gotas de 60 µL cada, permanecendo três tempos de 30 segundos. Este período deverá ser finalizado em microgota de 3 µL de SV2 contendo os oócitos, que será depositada diretamente no suporte metálico submerso em nitrogênio líquido. Logo após, as microgotas vitrificadas

deverão ser colocadas nas palhetas encaixadas na estrutura, que serão desencaixadas do suporte e seladas, e desta forma os oócitos são armazenados em palhetas.

[035] Desvitrificação: uma extremidade da palheta deverá ser cortada ainda em submersão no nitrogênio líquido, e na sequência em seguida esta extremidade deverá ser voltada rapidamente para uma gota de 500 µL da solução de trealose 0,3 M aquecida a 37°C para que as microgotas caiam nesta solução, permanecendo durante 3 minutos. Após este período, os oócitos vitrificados/desvitrificados deverão ser lavados em três gotas de 60 µL cada de TCM-199 adicionado de 10% de SFB inativado.

[036] **Figura 1.** Ilustração da visão frontal do suporte metálico utilizado na vitrificação de oócitos de mamíferos. O suporte deverá ser utilizado para a manipulação e armazenagem em palhetas das microgotas vitrificadas contendo os oócitos. A estrutura deverá medir 16,4 cm de comprimento, 20 cm de largura, 13 cm de altura e 4,5 cm de profundidade. Esta estrutura contém poros com 3 mm de diâmetro que permitem o encaixe de seis palhetas de 0,5 mL.

[037] **Figura 2.** Ilustração da visão superior do suporte metálico utilizado na vitrificação de oócitos de mamíferos. A seta indica microgota contendo os oócitos, que foi depositada e vitrificada no suporte. Os seis poros (3 mm de diâmetro cada) permitem o encaixe de palhetas de 0,5 mL. A microgota será acondicionada na palheta com auxílio de pinça previamente congelado no nitrogênio líquido.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de vitrificação de oócitos de mamíferos caracterizado por:

(a) utilização de estrutura metálica que permite um melhor manuseio durante o processo e possibilita uma maior viabilidade dos oócitos no final do processo;

(b) óocitos de mamíferos;

(c) adição de copolímero bloqueador de gelo X-1000 ao meio de vitrificação que possibilita uma maior viabilidade dos oócitos no final do processo de vitrificação;

(d) uma solução de vitrificação que contenha os seguintes crioprotetores: etilenoglicol, DMSO, sacarose;

2. Método de vitrificação de acordo com a reivindicação **1**, caracterizado por utilizar oócitos de eqüinos, bovinos, ovinos, suínos, caprinos, humanos, coelhos, caninos e roedores;

3. Método de vitrificação de acordo com as reivindicações **1 e 2** caracterizado por vitrificar oócitos em seu estágio imatura, de vesícula germinativa, e no estágio maturo, de metáfase II;

4. Estrutura metálica conforme reivindicação **1**, caracterizada pela utilização de palhetas para a vitrificação dos oócitos;

5. Método de vitrificação de acordo com a reivindicação **1** caracterizado por vitrificar os oócitos e embriões citados na reivindicação **2**;

6. Método de vitrificação de acordo com a reivindicação **1** caracterizado por possibilitar a vitrificação dos embriões transgênicos das espécies citadas na reivindicação **2**.

Desenhos

Figura 1.

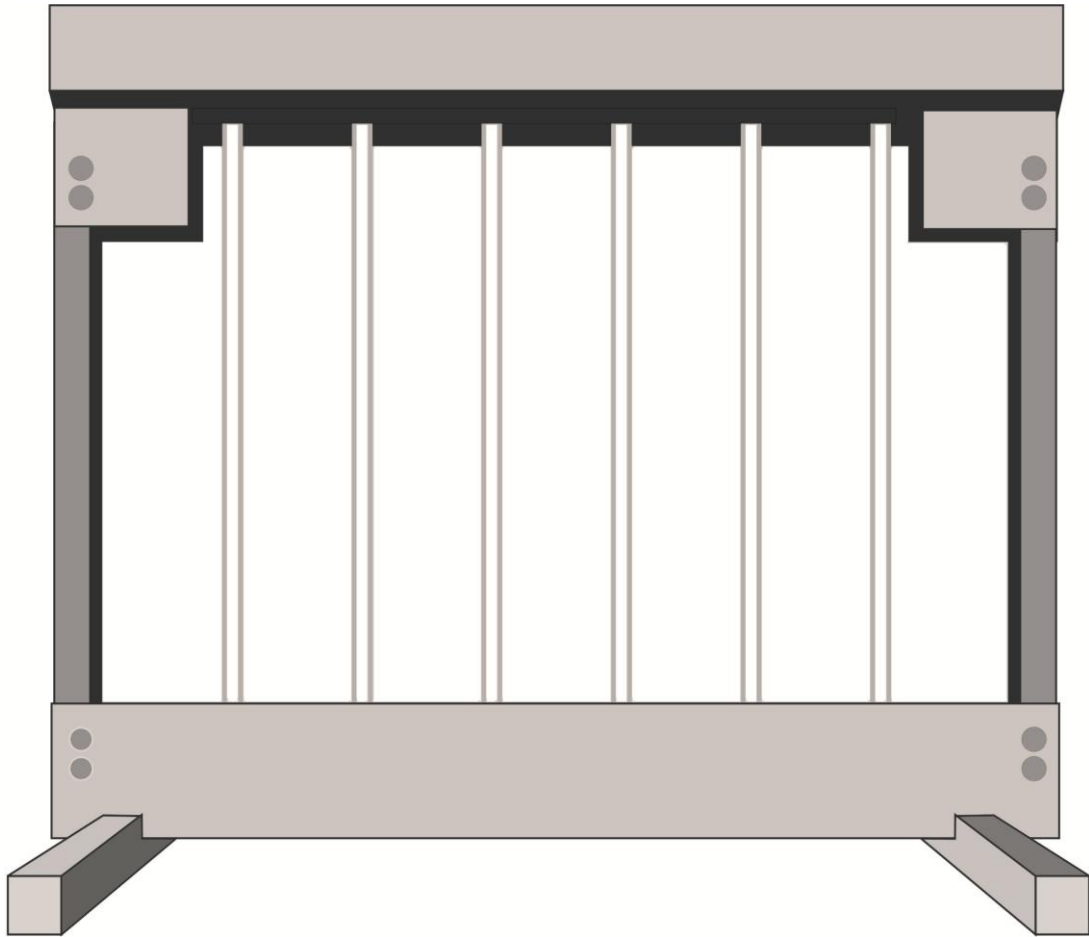
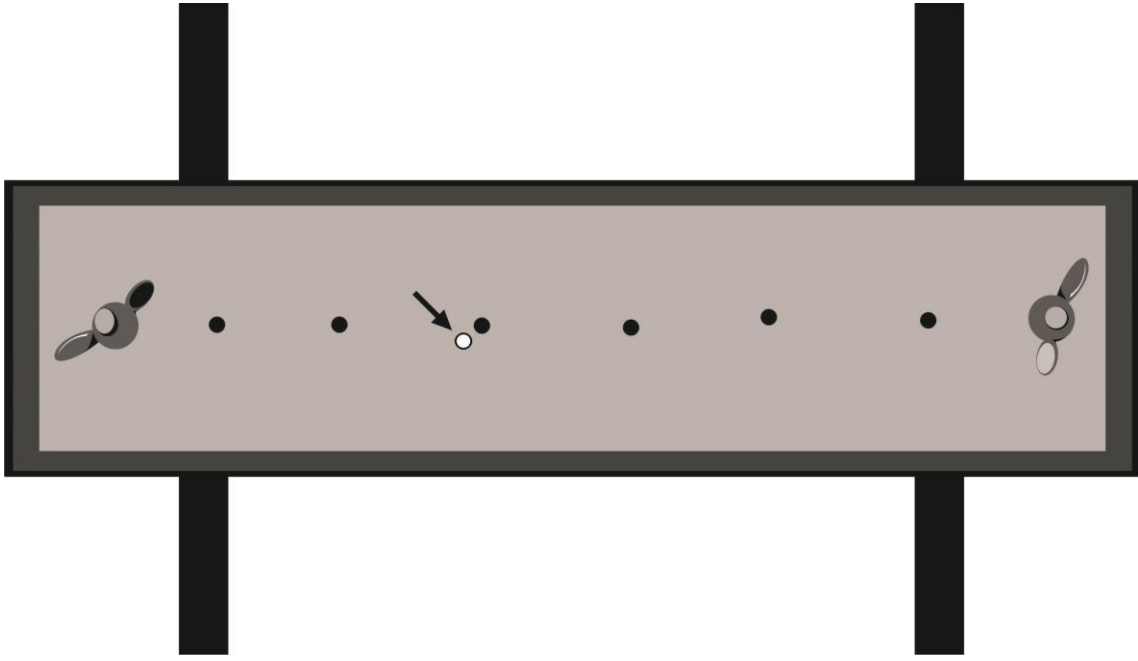


Figura 2.



Resumo da Patente de Invenção para: **"TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EM SUPORTE METÁLICO"**

A presente invenção refere-se a criopreservação de oócitos de mamíferos utilizando suporte metálico, e mais particularmente refere-se a estrutura metálica criada para vitrificação, servindo esta como suporte para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos em palhetas; e a adição de copolímero bloqueador de gelo às solução crioprotetoras de vitrificação.

Existe no estado da técnica uma carência no método de acondicionamento das microgotas vitrificadas contendo os oócitos, e além disso, a principal causa de crioinjúrias celulares é a formação de gelo intra e extra celular. Em vista disto, a presente invenção abrange um suporte metálico, que facilita a manipulação das microgotas vitrificadas contendo os oócitos, poi permite o armazenamento em palhetas de 0,5 mL; e a adição de copolímero bloqueador de gelo nas soluções de vitrificação, a fim de diminuir as crioinjúrias causadas às células. A presente invenção refere-se à metodologia de criopreservação ultrarrápida, ao qual foi elaborada para ser utilizada em laboratórios de biotécnicas reprodutivas especializados.