



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

(21) BR 202013019739-0 U2



(22) Data do Depósito: 02/08/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 21/11/2018

(54) Título: CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS

(51) Int. Cl.: A01N 1/02; F25D 25/00.

(52) CPC: A01N 1/02; A01N 1/0257; F25D 25/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) Inventor(es): ADRIANA BOS-MIKICH; LUCAS DANIELLI.

(57) Resumo: O presente pedido de patente refere-se a um dispositivo metálico para vitrificação e criopreservação de tecidos. É descrita uma cápsula fabricada em metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), que garante uma velocidade de resfriamento maior que o plástico --tradicionalmente utilizado - e o não contato com o nitrogênio líquido (cápsula hermeticamente fechada, contendo um forro interno de teflon) não permite a possibilidade de contaminação com patógenos potencialmente existentes no nitrogênio líquido.

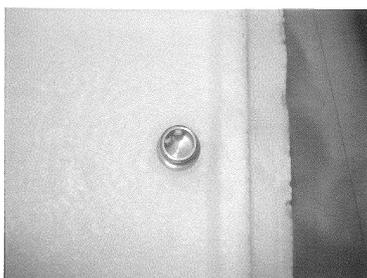


Figura 1

CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Campo da Invenção

O presente pedido de patente de modelo de utilidade refere-se a
5 um dispositivo metálico para vitrificação e criopreservação de tecidos. É
descrita uma cápsula fabricada em metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), que
garante uma velocidade de resfriamento maior que o plástico –tradicionalmente
utilizado - e o não contato com o nitrogênio líquido (cápsula hermeticamente
10 fechada, contendo um forro interno de teflon) não permite a possibilidade de
contaminação com patógenos potencialmente existentes no nitrogênio líquido.

Antecedentes da Invenção

A técnica de criopreservação por vitrificação consiste em preservar,
preferencialmente oócitos, embriões e espermatozóides em nitrogênio líquido
(NLiq), entre outros materiais biológicos, sem que haja a formação de cristais
15 de gelo intracelular, usando a técnica de resfriamento muito rápido, que permite
armazenar o material por tempo indeterminado. A temperatura de vitrificação e
armazenamento deve ser de aproximadamente 196° C negativos.

De forma a testar a eficiência da cápsula metálica como veículo para
vitrificação de tecido ovariano foram empregadas as soluções de vitrificação e
20 aquecimento descritas por Kuwayama e colaboradores, em “Cryotop method –
Vitrification Protocol of Embryo”, 2005, sendo a metodologia por nós adaptada
para o tecido ovariano. As soluções são preparadas no dia anterior em meio
HTF (Irvine) acrescido de 20% de soro substituto sintético (SSS-Irvine).
Primeiramente, a solução de equilíbrio consta de 7.5% de etileno glicol (EG;
25 Sigma), 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). A solução de vitrificação
propriamente dita consta de 15% EG, 15%DMSO e 0.5% de sacarose (Sigma).
As soluções são filtradas com filtros 0.22µm, aliquotadas e mantidas a 4° C até
uso.

Nestes procedimentos, os fragmentos ovarianos são obtidos a partir da
30 dissecação da camada cortical de ovários bovinos provenientes de abatedouros.

Estas fatias de córtex ovariano são seccionadas em fragmentos de cerca de 1x1x2 mm com lâmina de bisturi e transferidos para a solução de equilíbrio com o auxílio do bisturi e de um pincel esterilizado de cerdas muito finas e delicadas. Os fragmentos permanecem nesta solução por 25 minutos e desta
5 passam para a solução de vitrificação onde permanecem por 15 minutos antes de serem transferidos com o mínimo volume de Solução de Vitrificação (SV) para o interior da base da cápsula metálica, a qual se encontra em uma bandeja de isopor contendo nitrogênio líquido. A tampa da cápsula, também mantida na bandeja contendo o nitrogênio líquido é então enroscada na base
10 com o auxílio de um par de fórceps e imediatamente todo o sistema é imerso no nitrogênio líquido.

Para aquecimento e remoção do crioprotetor são utilizadas três soluções de aquecimento preparadas em meio HTF acrescido de 20% SSS, sendo que uma contem sacarose 1M, outra 0,5M e última 0,25M. A cápsula é removida do
15 nitrogênio líquido e exposta à temperatura ambiente por 30 segundos e imersa em banho Maria a 37° C por outros 10 segundos. A tampa da cápsula é aberta e verifica-se se o conteúdo está totalmente desvitrificado, antes de ser removido da mesma e transferido à solução de aquecimento contendo 1M de sacarose por 5 minutos, seguida pela transferência às soluções de 0,5M e
20 0,25M, por 5 minutos cada. Assim, o material está apto a ser cultivado em uma incubadora de CO₂ em meio HTF, para posterior transferência à receptora ou fixado para estudos histológicos.

As metodologias descritas nas publicações mais recentes sobre criopreservação de tecido ovariano para pacientes oncológicos expõem os
25 fragmentos de tecido diretamente ao nitrogênio líquido e/ou empregam veículos plásticos, maus condutores, para o armazenamento do tecido no nitrogênio líquido (NLiq.).

Artigos e publicações anteriores referentes à criopreservação de tecido ovariano, especialmente humano, utilizam o método lento, que causa indução
30 de gelo no interior das células, um fenômeno que é muito deletério para as células gaméticas femininas, os oócitos e os folículos que os envolvem. Para

estas células germinativas e seu envoltório folicular, o melhor método de criopreservação esta se mostrando mundialmente ser a vitrificação (Kuleshova and Lopata, em "Vitrification can be more favorable than slow cooling", 2002; Courbiere et al., em "Cryopreservation of the ovary by vitrification as na
5 alternative to slow-colling protocols", 2006; Sheikhi et al., em "Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: na ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue", 2011).

Ainda, nos métodos apresentados em artigos anteriores, os veículos de acondicionamento das células ou tecidos em questão são de plástico, um
10 elemento com menos condutividade que o metal, nossa proposta de modelo de utilidade.

Levando-se em conta que a deposição dos fragmentos de tecido dentro de um receptáculo metálico, o qual está em contato com o nitrogênio líquido para induzir a vitrificação e evitar uma possível contaminação por patógenos
15 presentes no NLiq., além de proporcionar uma maior velocidade de queda da temperatura, fator crucial para as melhores taxas de sucesso com esta técnica de criopreservação.

No estado da técnica, foram localizados alguns documentos que descrevem dispositivos e métodos de criopreservação e também de
20 vitrificação, alguns são descritos a seguir:

A patente WO2012054892 (A1) – 26/04/2012 - CRYOPRESERVATION SOLUTIONS AND USES THEREFOR, descreve uma estrutura cilíndrica aberta internamente separada em duas regiões por uma barreira com tampões em
25 forma de funil nas extremidades: uma para inclusão da solução de criopreservação e a outra para a marcação do seu conteúdo. Não descreve precisamente de que é feito esta estrutura e parece bastante complicado na hora de manipular o material biológico e realizar a criopreservação.

Na patente US2012040450 (A1) – 16/02/2012 - APPARATUSES AND COMPOSITIONS FOR CRYOPRESERVATION OF CELLULAR
30 MONOLAYERS, os autores descrevem a disposição de aparelhos ou receptáculos para a criopreservação de células em que o container fabricado

de material biocompatível apresenta um mecanismo para a indução de gelo durante a criopreservação, trata-se, portanto de um receptáculo para congelamento lento e o que nós queremos evitar com nosso método é a criação de gelo intracelular visto que este fenômeno danifica as células levando-as à morte no momento do descongelamento. Por isso nos dedicamos à vitrificação em que a criopreservação não inclui a formação de cristais de gelo e sim a formação de uma solução em estado vítreo incorporando o material biológico.

US2012020934 (A1) – 26/01/2012 - MATERIALS AND METHODS FOR CRYOPRESERVED BONE CONSTRUCTS, neste documento é utilizado o congelamento lento, não vitrificação e, portanto há indução de cristais de gelo nas células.

US2010136686 (A1) – 03/06/2010 - APPARATUS AND METHOD FOR CULTURING AND PRESERVING TISSUE CONSTRUCTS, esta invenção descreve um biorreator, um equipamento destinado a “fabricação” de tecidos para fins clínicos. Os autores inventaram um biorreator no qual as etapas de semeadura das células em uma matriz contida em um sistema fechado, e, portanto com baixo risco de contaminação, podem ser deixadas proliferar pelo tempo necessário e reconstituir órgãos (como a pele) sem a interferência do meio exterior. Os autores mencionam ainda a possibilidade de perfusão de crioprotetores para criopreservação das células e tecidos, novamente sem qualquer contato com o ambiente exterior, mas não citam qual o método de criopreservação nem os crioprotetores utilizados. Fato relevante é a descrição de um possível dano ao recipiente externo do biorreator durante o processo de criopreservação “sem que haja comprometimento do material contido em seu interior”. Por esta afirmativa presume-se que o material empregado na confecção do recipiente externo não é criogênico e não deve suportar baixas temperatura como a do NLiq.

JP2008067719 (A) – 27/03/2008 - ICE SEEDING APPARATUS FOR CRYOPRESERVATION SYSTEM – esta invenção se refere a “seeding”, o que

significa congelamento lento e, portanto, formação de cristais de gelo, que é muito prejudicial para o processo de criopreservação.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção.

5 Sumário da Invenção

A presente invenção descreve uma cápsula fabricada de metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), que garante uma velocidade de resfriamento maior que o plástico –tradicionalmente utilizado- e o não contato com o nitrogênio líquido (cápsula hermeticamente fechada, contendo um forro interno de teflon) não
10 permite a possibilidade de contaminação com patógenos potencialmente existentes no nitrogênio líquido.

É um objeto da presente invenção a produção de uma cápsula metálica fabricada em aço inox 304, porém não se restringindo a esse, para a criopreservação de amostras biológicas em nitrogênio líquido.

15 Em uma realização preferencial, a cápsula metálica pode ser confeccionada em aço inox 304, em titânio ou outro aço cirúrgico biocompatível.

Em uma realização preferencial, as amostras biológicas são fragmentos de tecido ovariano.

20 É ainda um objeto da presente invenção a produção de uma cápsula metálica com tampa contendo teflon para fechamento hermético.

O uso de uma cápsula metálica hermeticamente fechada e fabricada com material biomédico tem como finalidade evitar o contágio das amostras biológicas por possíveis patógenos presentes no nitrogênio líquido no momento
25 de se efetuar a vitrificação para criopreservação de tecido ovariano ou potencialmente qualquer outro tecido desejado.

Apresenta como vantagens a eficiência na vitrificação, a não contaminação das amostras e a praticidade de uso.

A principal novidade da invenção é a união do método de preservação
30 principalmente dos folículos ovarianos primários e primordiais e seus oócitos (gameta feminino) à técnica de vitrificação que é uma metodologia que evita a

5 formação de cristais de gelo intracelulares utilizando um veículo metálico que
baixa a temperatura mais rapidamente que o plástico, material tradicionalmente
utilizado nos métodos de criopreservação. Cabe mencionar que a presente
invenção descreve uma cápsula de vitrificação que se assemelha a um criotubo
10 plástico tradicionalmente utilizado para armazenar os mais diferentes tipos de
materiais e soluções em quaisquer temperaturas inclusive em nitrogênio líquido
(Sheikhi et al., em “Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: na
ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue”, 2011).
Entretanto, o metal é um condutor muito mais eficiente e, portanto, para o
15 processo de vitrificação deve ser mais adequado visto a queda brusca da
temperatura que é um fator fundamental para o sucesso desta metodologia de
criopreservação.

Outro ponto de grande importância neste invento é o fato de que o
material biológico, no caso fragmentos de tecido ovariano, são transferidos da
15 solução de vitrificação em que se encontram com o auxílio de pincéis de cerdas
muito delicadas diretamente para o interior da base da cápsula, que se
encontra em contato com o NLiq., figura 1, de forma a nunca entrar em contato
com o mesmo, pela profundidade do corpo da cápsula, nem com o seu vapor.
Esta característica nos permite dizer que o material biológico está protegido de
20 possível contágio por patógenos existentes no NLiq. e assim tem todo potencial
para aplicação em clinica humana.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados
pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão
descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

25 **Descrição dos Anexos (Figuras)**

Figura 1 – Mostra fragmentos ovarianos no interior do corpo da cápsula de
criopreservação;

Figura 2 – Tampa com teflon no interior, juntamente com o corpo (base da
cápsula) no nitrogênio líquido;

30 Figura 3 – Apresenta o corpo e a tampa da cápsula metálica em detalhe.

Descrição Detalhada da Invenção

O invento cápsula metálica para vitrificação servirá para executar a criopreservação de tecido ovariano humano através da vitrificação oferecendo a vantagem de não permitir que haja contato direto do tecido com o nitrogênio líquido, ao mesmo tempo em que ocorre uma maior e mais rápida queda de temperatura do que quando são utilizados recipientes plásticos para esta técnica de criopreservação. Desta forma evita-se uma possível transmissão de patógenos ao material criopreservado, dentro das diretrizes de procedimentos com "grau clínico" para terapias humanas e promove-se uma maior eficácia na preservação da integridade do tecido pós-criopreservação.

O presente invento é composto por uma cápsula metálica para criopreservação de material biológico em Nitrogênio Líquido, primariamente visando a criopreservação de tecido ovariano de pacientes oncológicas.

Trata-se de um estojo em aço inox 304 para acondicionamento de material biológico em criogenia. A cápsula foi usinada a partir de um bloco maciço de aço de inox sendo que no fundo da porção superior (tampa) da cápsula foi inserida uma membrana de teflon, para garantir a vedação. A cápsula é fechada através de um sistema de rosca universal com 20 fios por polegada no bloco (corpo) e na tampa. Externamente, a cápsula é talhada com recartilho na parte exterior para facilitar o grip. As medidas externas do corpo da cápsula (porção onde o material biológico é depositado internamente) são de 16mm, comprimento total 21mm, sendo 8mm de rosca. O volume da massa do corpo da cápsula é de 12 x 16 mm. Na porção interna onde é depositada a amostra biológica temos as medidas de 10 x 10mm (785mililitros). A tampa da cápsula tem um diâmetro externo de 16.5mm, comprimento total de 11mm e a profundidade interna até o anel de vedação (teflon) de 7.5mm, os quais correspondem ao comprimento total da rosca interna. O diâmetro externo da rosca no corpo da cápsula (bloco) é de 13mm. Para facilitar o fechamento e abertura da cápsula, a porção da rosca foi untada com óleo mineral (grau clínico-IrvineScientific), antes da exposição ao nitrogênio líquido. Esta primeira versão da cápsula de criogenia para tecido ovariano, que está sendo utilizada

para os testes histológicos, *in vitro* e subseqüentemente *in vivo* em animais experimentais, deverá ser fabricada em aço cirúrgico para atender as condições de uso com grau clínico em tratamentos de oncofertilidade humana ou afins.

Reivindicações

1. CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS **caracterizada** por ser para a criopreservação de amostras biológicas em nitrogênio líquido pela técnica de vitrificação.
5
2. CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por ser fabricada preferencialmente em aço Inox 304, em titânio ou aço cirúrgico biocompatível.
- 10 3. CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS de acordo com as reivindicações 1-2, **caracterizada** por ser hermeticamente fechada com tampa com membrana de teflon para vedação.
- 15 4. CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE BIOMATERIAIS de acordo com as reivindicações 1-3, **caracterizada** por compreender as proporções de medidas externas do corpo da cápsula (porção onde o material biológico é depositado internamente) serem de 16 mm, comprimento total 21mm, sendo 8mm de rosca; o volume da massa do corpo da cápsula de 12 x 16 mm; na porção interna onde é
20 depositada a amostra biológica temos as medidas de 10 x 10 mm (785mililitros); a tampa da cápsula com um diâmetro externo de 16,5mm, comprimento total de 11mm e a profundidade interna até o anel de vedação (teflon) de 7,5mm, os quais correspondem ao comprimento total da rosca interna; o diâmetro externo da rosca no corpo da cápsula
25 (bloco) é de 13mm.

Anexos
Figuras



Figura 1

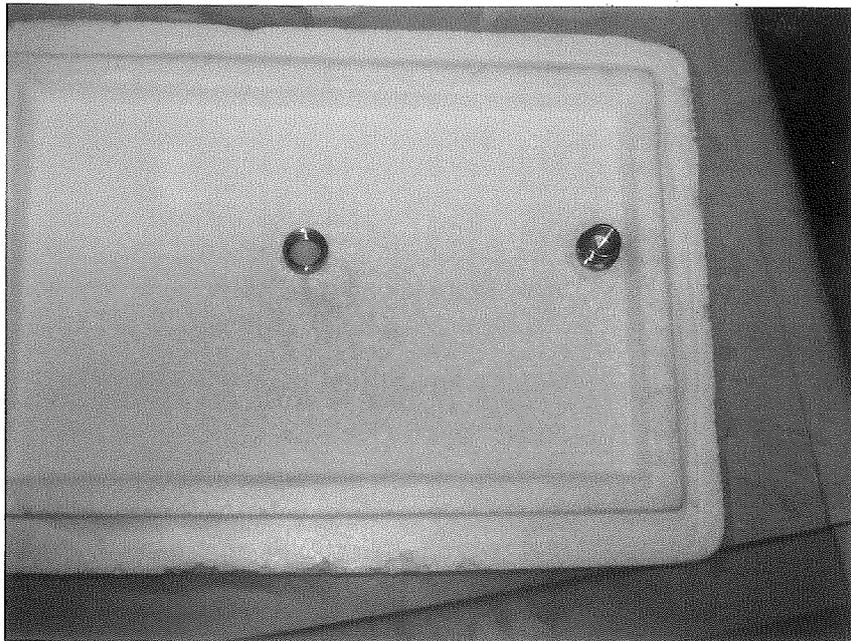


Figura 2



Figura 3

Resumo**CÁPSULA METÁLICA PARA VITRIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
BIOMATERIAIS**

O presente pedido de patente refere-se a um dispositivo metálico para
5 vitrificação e criopreservação de tecidos. É descrita uma cápsula fabricada em
metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), que garante uma velocidade de
resfriamento maior que o plástico –tradicionalmente utilizado - e o não contato
com o nitrogênio líquido (cápsula hermeticamente fechada, contendo um forro
interno de teflon) não permite a possibilidade de contaminação com patógenos
10 potencialmente existentes no nitrogênio líquido.