



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 024600 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL JAYME DE ALTAVILA - FEJAL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 12207742000171

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: RUA CONEGO MACHADO, Nº 918 - FAROL

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57051-160

País: Brasil

Telefone: 82 3215 5011

Fax:

Email: michella.grey@cesmac.edu.br

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus A. C. Simões. Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS FELINOS COM HEMI-PALHETAS

Resumo: A presente patente invenção descreve um processo de criopreservação através da técnica de vitrificação de células germinativas femininas, preferencialmente oócitos felinos imaturos compreendendo a etapa de exposição dos oócitos felinos ao álcool polivinílico, juntamente com outros crioprotetores, de modo que os oócitos após à exposição a estes agentes crioprotetores são posteriormente transferidos a hemi-palhetas francesas de 0,25 cc.

Figura a publicar: proc

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: MARIANA MENDONÇA MAIA CAVALCANTE

CPF: 07728716476

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: R. João Paulo Pelegrino, nº 79, Jatiúca

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57035-775

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marianammaiacavalcante@gmail.com

Inventor 2 de 8

Nome: DIOGO RIBEIRO CÂMARA

CPF: 02830461479

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Unidade de Ensino de Viçosa, Fazenda São Luiz, S/N

Cidade: Viçosa

Estado: AL

CEP: 57700-970

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: diogo@vicosa.ufal.br

Inventor 3 de 8

Nome: ANA GABRIELA ALMEIDA LUNA VIEIRA

CPF: 06585909445

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Adolfo Camerino – Pinheiro, nº 992

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 06585-909

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: gabilunag15@gmail.com

Inventor 4 de 8

Nome: MÁRCIO CALIXTO MATIAS

CPF: 09768318481

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Marechal Deodoro, nº 1, Alto do Socorro

Cidade: São Bras

Estado: AL

CEP: 57380-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marciocalixtovet@live.com

Inventor 5 de 8

Nome: VALESCA BARRETO LUZ

CPF: 04347568495

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: R. Esther Silveira Costa, 62, Farol

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: valesca.luz@cesmac.edu.br

Inventor 6 de 8

Nome: CAMILA CALADO DE VASCONCELOS

CPF: 06059559484

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: R. Ailton Torres, 66, Condomínio Parque das Palmeiras, apto. 1804,
Serraria

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: cml.calado@hotmail.com

Inventor 7 de 8

Nome: AGNELO DOUGLAS NASCIMENTO JÚNIOR

CPF: 08254980403

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Residencial Monte Verde, quadra K, nº 2, Antares

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57048-042

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: agnelo.douglas@gmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: IVONILDA DE ARAUJO MENDONÇA MAIA

CPF: 38236869415

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: R. João Paulo Pelegrino, nº 79, Jatiúca

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: ivonildamaia@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante_2020-11-27_162914.pdf
Desenho	Figuras -CORRETO.pdf
Resumo	Resumo-correto.pdf
Relatório Descritivo	pedido de patente finalizado-correto.pdf
Reivindicação	Reivindicações patente finalizado-corrigido.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Comprovante de Pagamento de Boleto

Operação realizada com sucesso conforme as informações fornecidas pelo cliente.

Banco Recebedor: CAIXA ECONÔMICA FEDERAL

Representação numérica do código de barras: 00190.00009 02940.916196
26772.112178 4
84810000007000

Instituição Emissora - Nome do Banco: BANCO DO BRASIL S/A

Código do Banco: 001

Beneficiário original / Cedente

Nome Fantasia: INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST

Nome/Razão Social: INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL . INP

CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37

Beneficiário Final

Nome/Razão Social: INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL . INP

CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37

Pagador Sacado

Nome/Razão Social: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL IAYME DE ALTAVILA FERREIRA

CPF/CNPJ:	12.207.742/0001-71
-----------	--------------------

**Pagador Final -
Correntista**

Nome/Razão Social:	VALESCA BARRETO LUZ
--------------------	---------------------

CPF/CNPJ:	043.475.684-95
-----------	----------------

Data do Vencimento:	26/12/2020
---------------------	------------

Data de Efetivação do Pagamento / Agendamento:	27/11/2020
--	------------

Valor Nominal do Boleto:	70,00
--------------------------	-------

Juros (R\$):	0,00
--------------	------

IOF (R\$):	0,00
------------	------

Multa (R\$):	0,00
--------------	------

Desconto (R\$):	0,00
-----------------	------

Abatimento (R\$):	0,00
-------------------	------

Valor Calculado (R\$):	70,00
------------------------	-------

Valor Pago (R\$):	70,00
-------------------	-------

Data/hora da operação:	27/11/2020 16:29:07
------------------------	---------------------

Código da operação:	032618491
---------------------	-----------

Chave de Segurança:	92EWCVTTS6MF4SQC
---------------------	------------------

* Você poderá consultar futuramente essa e outras transações no item "Minhas Transações", opção "Consultas - Comprovantes".

FIGURAS

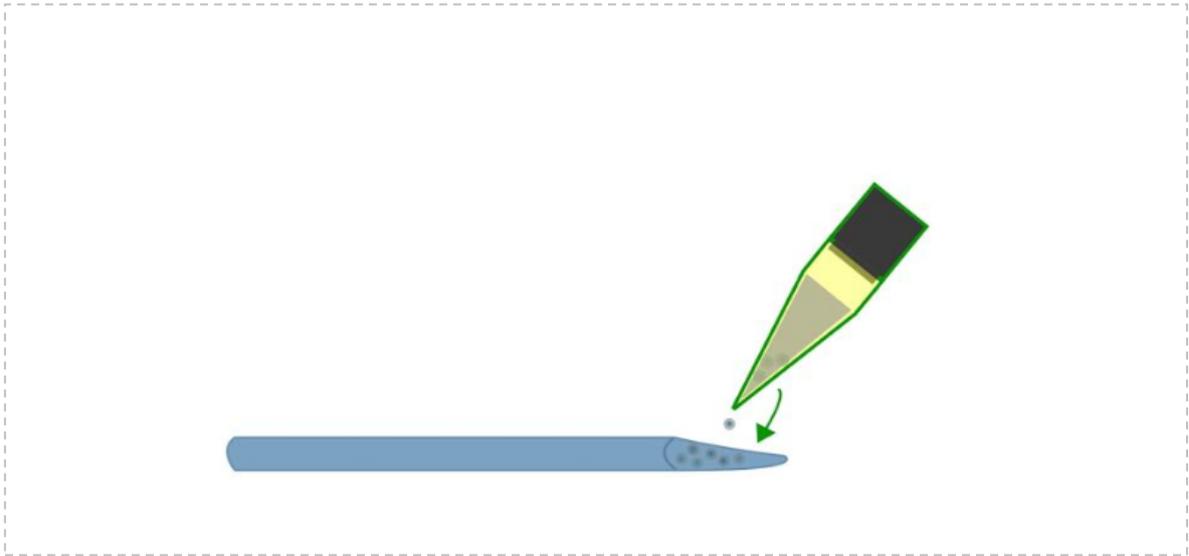


Figura 1

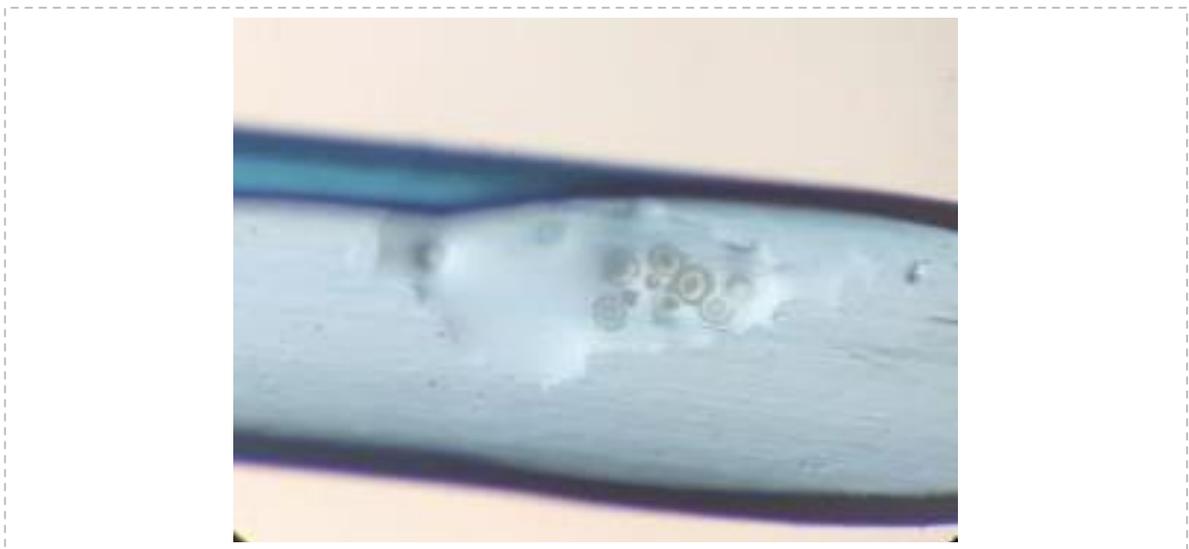


Figura 2

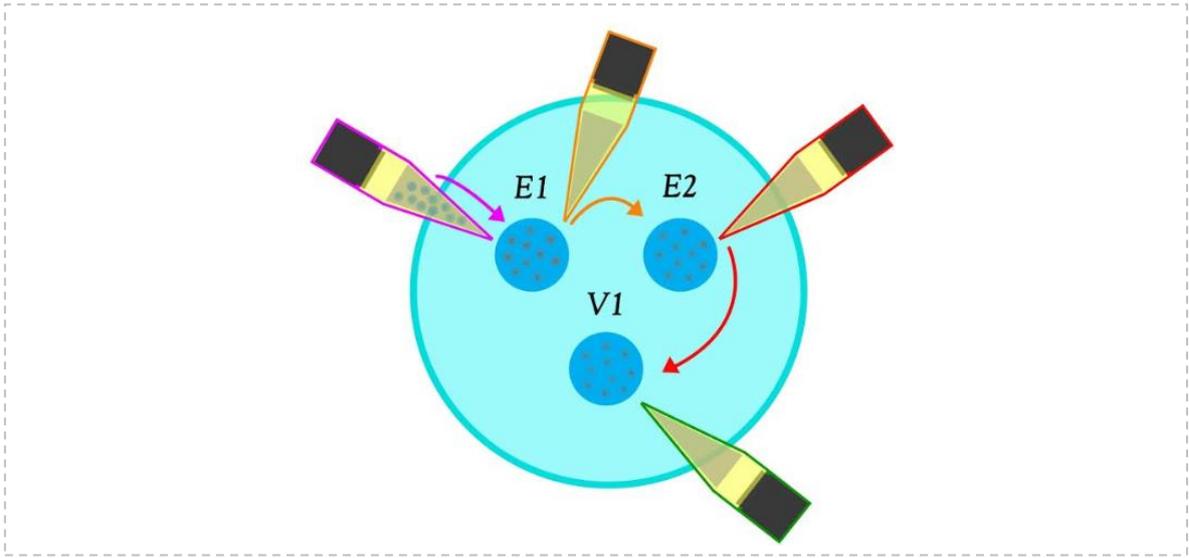


Figura 3

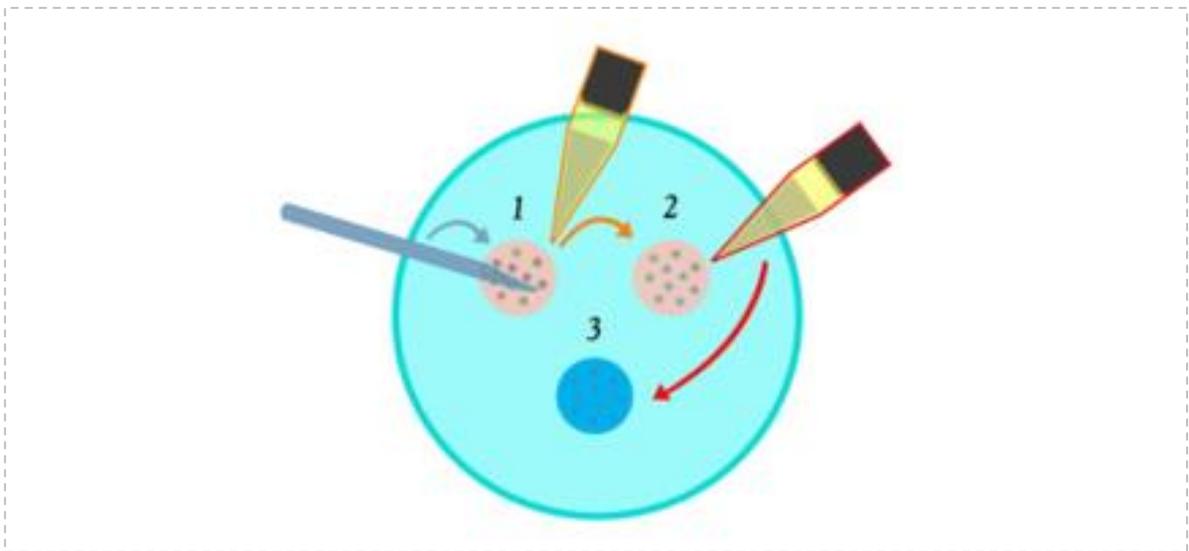


Figura 4

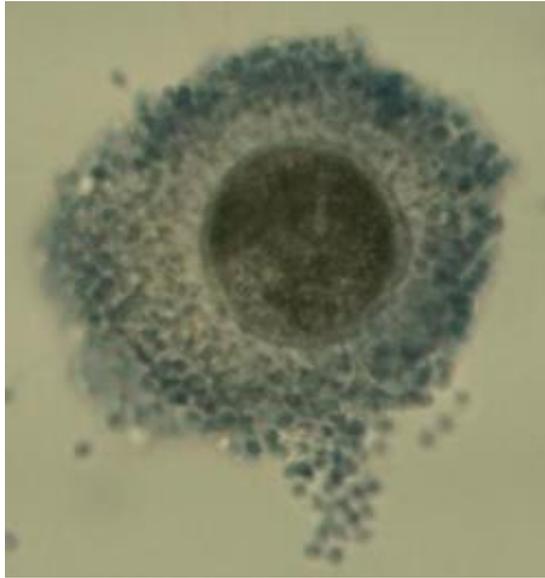


Figura 5

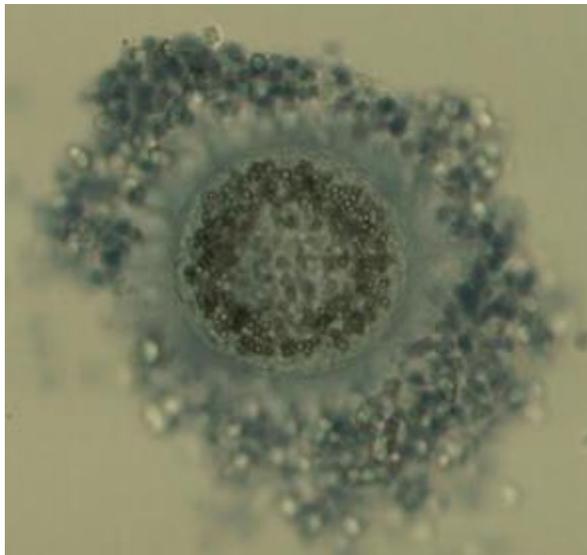


Figura 6

RESUMO

PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS FELINOS COM HEMI-PALHETAS

A presente patente invenção descreve um processo de criopreservação através da técnica de vitrificação de células germinativas femininas, preferencialmente oócitos felinos imaturos compreendendo a etapa de exposição dos oócitos felinos ao álcool polivinílico, juntamente com outros crioprotetores, de modo que os oócitos após à exposição a estes agentes crioprotetores são posteriormente transferidos a hemipalhetas francesas de 0,25 cc.

PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS FELINOS COM HEMI-PALHETAS

Campo da invenção

[001] A presente invenção descreve o processo de produção do meio; além disso, também é descrito um processo de vitrificação de células germinativas femininas, preferencialmente oócitos felinos imaturos compreendendo a etapa de exposição dos oócitos felinos ao álcool polivinílico, juntamente com outros crioprotetores, de modo que os oócitos após à exposição a estes agentes crioprotetores são posteriormente transferidos a hemi-palhetas francesas de 0,25 cc. Adicionalmente, a presente invenção descreve um meio de criopreservação de células germinativas femininas compreendendo etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), álcool polivinílico, sacarose e solução salina tamponada. A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia.

Fundamentos da invenção

[002] Visando a proteção e manutenção de espécies ameaçadas de extinção, foram desenvolvidas várias técnicas para conservação de recursos biológicos como estratégia para a manutenção da biodiversidade e variabilidade genética, especialmente para felídeos selvagens ameaçados de extinção (JANECKA *et al.*, 2014; KENNEY *et al.*, 2014).

[003] Nesse contexto, a constituição de bancos de germoplasma por procedimentos de criopreservação ainda é a técnica de escolha para o armazenamento a longo prazo de gametas por tempo indeterminado sem praticamente nenhuma mudança em sua funcionalidade. Os protocolos utilizando germoplasma de felídeos selvagens podem ser preliminarmente explorados em gatos domésticos para que depois sejam estendidos às espécies selvagens

[004] A criopreservação em fêmeas pode ser executada por intermédio da técnica de vitrificação de oócitos. Nessa perspectiva, a vitrificação é um método termodinâmico que consiste em submeter os oócitos a criotemperaturas até que os mesmos adquiram as propriedades de um sólido. Isto permite uma redução na formação de cristais de gelo intracelulares (ARAYATHAM, TIPTAVAVATANNA, THARASANIT, 2017; BAGCHI,

WOODS, CRISTER 2014; MACHADO *et al.*, 2016; SANTIN, BLUME, MONDADORI, 2009).

[005] Para essa biotécnica, os crioprotetores são altamente necessários, por serem os responsáveis pela substituição parcial de água na célula, o que permite a sua criopreservação. Contudo, altas concentrações de crioprotetores são citotóxicas a temperatura ambiente durante o período de exposição ao agente crioprotetor e no momento da descongelação.

[006] Por isso, com o objetivo de diminuir o período de exposição dos oócitos aos agentes crioprotetores na temperatura ambiente, bem como diminuir a citotoxicidade de crioprotetores e aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos, vários meios e instrumentos de vitrificação foram desenvolvidos para diferentes espécies.

[007] Entretanto, para a espécie felina, há escassez de registro a respeito de meios, bem como de dispositivos de vitrificação voltados para essa espécie. Em revisão de literatura prévia, foi constatado que os meios de vitrificação para essa espécie são constituídos basicamente de meios comerciais (como o TCM-199®) acrescidos de crioprotetores como o etilenoglicol, dimetilsulfóxido e soro fetal bovino para conferir estabilidade à membrana plasmática, além de algum dissacarídeo com algumas diferenças pontuais de autor para autor (MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2019; FERNANDEZ-GONZALEZ e JEWGENOW, 2016).

[008] Contudo, a utilização de soro fetal bovino é algo controverso por uma série de razões. Sendo a probabilidade de contaminação do soro fetal bovino uma das razões mais importantes para a sua substituição em meios de criopreservação. Já que, de acordo com VALK *et al.* (2010), cerca de 20-50% de soro fetal bovino produzido no mundo é contaminado com vírus.

[009] Nesse sentido, a utilização de álcool polivinílico em meios de criopreservação é uma alternativa de substituição ao soro fetal bovino, sendo já descrita com sucesso em protocolos para a espécie bovina, ovina e equina (ASADA *et al.*, 2002; NAITANA *et al.*, 1997). Apesar de haver relato de sua utilização nas diferentes espécies supracitadas, não há relatos em literatura a respeito de sua utilização na espécie felina.

[0010] No tocante ao instrumento responsável por conservar o meio de vitrificação juntamente com os oócitos vitrificados no botijão de nitrogênio, existe um amplo relato na literatura. Em felinos, há relatos da utilização do Cryotop® (FERNANDEZ-GONZALEZ e JEWGENOW, 2017; OCHOTA, WOJTASIK, NIZANSKI, 2017; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012; HERRICK, WANG, MACHATY, 2016; GALIGUIS *et al.*, 2014), criotubos (LIMA *et al.*, 2018; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012), cryoloop (SOWINSKA *et al.*, 2017), pipeta de desnudamento flexipet (THARASANIT *et al.*, 2011), palheta aberta (COCCHIA *et al.*, 2010) e hemi-palhetas de 0,25 cc acrescidas de bolhas de ar e conteúdo de vitrificação de 15 µL a 20 µL e seladas com calor (THURATUM *et al.*, 2018; APPARICIO, RUGGERI, LUVONI, 2013).

[0011] Como apresentado acima, apesar da existência de relato na literatura de dispositivos para a vitrificação de oócitos felinos, não há relatos a respeito da utilização da técnica adaptada de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc sem a aspiração de bolhas de ar, com deposição de no máximo 2 µL a 3 µL de conteúdo a ser vitrificado e sem a utilização de temperatura para o selamento da hemi-palheta.

[0012] Esse tipo de técnica adaptada de vitrificação com o auxílio de uma hemi-palheta francesa é de extrema importância para a preservação da viabilidade oocitária após a criopreservação. Visto que quanto menor a concentração do agente crioprotetor na palheta, menor a citotoxicidade ao oócito e maior a sua viabilidade pós-vitrificação (CASTRO *et al.*, 2011; ARGYLE *et al.*, 2016; MUNCK e VAJTA, 2017; FAUSTINO *et al.*, 2011).

[0013] Recentemente, realizamos a vitrificação de oócitos felinos na presença de álcool polivinílico com a utilização de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc com uma quantidade de 2 µL a 3 µL de conteúdo vitrificado, sem a presença de bolhas de ar e selamento térmico e verificamos que a viabilidade foi preservada em valores aceitáveis.

[0014] No âmbito patentário, foram encontrados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

[0015] O documento PI1106685-7 refere-se a uma estrutura metálica criada para vitrificação, servindo como suporte para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos em palhetas; e a adição de copolímero bloqueador de gelo às soluções

crioprotetoras de vitrificação. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 μ L a 3 μ L do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

[0016] O documento PI1101451-2 refere-se à preservação de todo o tecido ovariano caprino e não apenas de oócitos, utilizando um meio com a adição de antioxidantes. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 μ L a 3 μ L do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

[0017] O documento BR1120130039299 se refere a um método de vitrificação superficial de embriões em nitrogênio líquido com a produção de uma gotícula de vitrificação. A gotícula de vitrificação é produzida a partir de um instrumento com um canal e vertida diretamente para dentro do nitrogênio em fase líquida produzindo uma gotícula vitrificada, que posteriormente é armazenada em criotubos. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 μ L a 3 μ L do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

[0018] O documento BR1020170224520 se refere a um dispositivo para vitrificação de tecido ovariano em superfície sólida constituído de três partes: base, insert e tampa; apresentando-se como um sistema fechado sendo este dispositivo aplicado apenas na vitrificação de tecido ovariano. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem

como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 µL a 3 µL do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

[0019] O documento BR1120170129450 compreende um dispositivo de criopreservação de sistema fechado com uma tampa alongada para fechar de forma vedável um espécime biológico com uma câmara oca alongada. A presente invenção difere desse documento por ser um dispositivo de vitrificação de sistema aberto, já que os oócitos a serem vitrificados são depositados em hemi-palhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel (o que configuraria um sistema de vitrificação fechado).

[0020] O documento BR2020130197390 abrange um dispositivo metálico para vitrificação e criopreservação de tecidos no formato de uma cápsula fabricada em metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), mais uma vez caracterizando um dispositivo de sistema fechado. A presente invenção difere desse documento por ser um dispositivo de vitrificação de sistema aberto, já que os oócitos a serem vitrificados são depositados em hemi-palhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel (o que configuraria um sistema de vitrificação fechado).

[0021] O documento BR1020160032920A2 descreve tecnologias para a criopreservação de embriões de ungulados para a implantação em fêmeas receptoras. A presente invenção difere desse documento por se tratar de um processo de vitrificação de oócitos exclusivamente felino com adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 µL a 3 µL do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

[0022] O documento PI 0605800-0 se configura por estar relacionado a uma haste de plástico de 0,5 mm de diâmetro com utilização em vitrificação de óvulos de humanos e

animais, que depois necessita ser inserida em um tubo plástico. A presente invenção difere desse documento por ter sido desenvolvido um meio de vitrificação de oócitos com adição de álcool polivinílico para vitrificação de oócitos felinos e vitrificados em hemipalhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemipalhetas (não é colocado em nenhum criotubo) e sem o fechamento da ponta em bisel.

[0023] Com a prospecção científica no âmbito patentário, pôde-se constatar que a técnica descrita nesse documento para a obtenção da patente de invenção é inédita na área e não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os processos da presente invenção, de forma que o processo de vitrificação aqui exposto é inédito.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 demonstra a deposição com o auxílio de uma pipeta do conteúdo de vitrificação (oócitos envoltos no meio de vitrificação) em uma hemipalhetta francesa de 0,25cc.

A Figura 2 ilustra a vista frontal de oócitos felinos depositados na extremidade em bisel de hemipalhetas francesas de 0,25cc com mínimo conteúdo de vitrificação (2µL a 3µL)

A Figura 3 apresenta a sequência de vitrificação dos oócitos felinos em meio artesanal contendo álcool polivinílico. As siglas E1 e E2, na figura, representam a solução de equilíbrio 1 e 2, que contém álcool polivinílico, DMSO e etilenoglicol em meio base de tampão fosfato salino (PBS). Já a sigla V1 representa a solução de vitrificação contendo álcool polivinílico, DMSO, etilenoglicol e sacarose em meio base PBS.

A figura 4 demonstra o protocolo de desvitrificação e coloração dos oócitos com o azul de tripan.

A figura 5 ilustra um oócito não-corado com azul de tripan e viável, com células do cumulus coradas ao redor.

A figura 6 apresenta um oócito corado com o azul de tripan e circundado com células do cumulus também coradas, de tal forma que o oócito foi classificado como não-viável.

Descrição da invenção

[0024] Em um aspecto, a presente patente de invenção descreve um processo de criopreservação através da técnica de vitrificação de células germinativas femininas, preferencialmente oócitos felinos imaturos compreendendo a etapa de exposição dos oócitos felinos ao álcool polivinílico, juntamente com outros crioprotetores, de modo que os oócitos após à exposição a estes agentes crioprotetores são posteriormente transferidos a hemi-palhetas francesas de 0,25 cc.

[0025] É um objeto da presente invenção um meio de preservação para células germinativas compreendendo solução de tampão fosfato salino associado ao etilenoglicol, dimetilsulfóxido, álcool polivinílico e sacarose. Além disso, há a diferenciação do processo de vitrificação com hemi-palhetas de 0,25 cc.

[0026] Em uma realização preferencial, o meio de preservação para células germinativas é utilizado em oócitos imaturos, mais especificamente, em oócitos imaturos da espécie felina para posterior vitrificação. Sendo esta realizada notadamente em hemi-palhetas de 0,25 cc, com a deposição dos oócitos imaturos juntamente com apenas 2 a 3 μ L do meio desenvolvido e sem que haja nenhuma vedação térmica ou mecânica na extremidade em bisel das hemi-palhetas.

[0027] Em uma realização preferencial, o meio de vitrificação compreende álcool polivinílico na concentração de 0,8% a 1,2% mais especificamente 1%.

[0028] Em uma realização preferencial, o meio de vitrificação compreende etilenoglicol na concentração de 7,5% a 15% mais especificamente 15%.

[0029] Em uma realização preferencial, o meio de vitrificação compreende dimetilsulfóxido na concentração de 7,5% a 15%, mais especificamente 15%.

[0030] Em uma realização preferencial, o meio de vitrificação compreende sacarose na concentração de 0,1M a 0,5M, mais especificamente 0,3M.

[0031] É um objeto da presente invenção um processo de produção de meio para preservação de células germinativas femininas de felinos compreendendo a etapa de adicionar álcool polivinílico ao etilenoglicol, dimetil-sulfóxido e sacarose.

[0032] Em uma realização preferencial, o processo de preservação de células germinativas femininas compreende a etapa de exposição de oócitos imaturos felinos a uma solução contendo 0,1% de álcool polivinílico, 7,5% de dimetil-sulfóxido, 7,5% de etilenoglicol em base PBS (84,9%) durante 30 segundos.

[0033] Em uma realização preferencial, o processo de preservação de células germinativas femininas compreende a etapa de exposição de oócitos imaturos felinos a uma solução contendo 0,1% de álcool polivinílico, 7,5% de dimetil-sulfóxido, 7,5% de etilenoglicol em base de PBS (84,9%) durante 4 minutos.

[0034] Em uma realização preferencial, o processo de preservação de células germinativas femininas compreende a etapa de exposição de oócitos imaturos felinos a uma solução contendo 0,1% de álcool polivinílico, 15% de dimetil-sulfóxido, 15% de etilenoglicol e 0,3M de sacarose em base de PBS (69,9%) durante 2 minutos.

[0035] Em uma realização preferencial, o processo de preservação de células germinativas femininas compreende a etapa de deposição dos oócitos com a solução de vitrificação na extremidade em bisel das hemi-palhetas de 0,25 cc, com o auxílio de uma pipeta de 10 µL. Em seguida, todo o excesso de meio é retirado com o auxílio de uma pipeta, deixando apenas cerca de 2 a 3 µL na extremidade em bisel da hemi-palheta, que não é selada e é diretamente submergida em nitrogênio líquido.

[0036] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses nesse segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução a seguir.

Exemplos de concretizações da invenção

Origem e Coleta dos Ovários

[0037] Os ovários foram obtidos assepticamente durante o procedimento de OvarioSalpingoHisterectomia (OSH) de gatas que se candidataram ao procedimento em clínicas veterinárias. Os ovários foram transferidos para tubos falcon de 50 mL contendo soro fisiológico a temperatura ambiente e encaminhados ao laboratório em até 1 hora.

[0038] Em seguida, foram colocados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo soro fisiológico (temperatura ambiente), onde foram fatiados com lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura (*slicing*), para a liberação dos COCs e posteriormente foram lavados com o auxílio de uma seringa com soro fisiológico e filtro coletor para serem realocados em placas de Petri (30 x 15mm) contendo soro fisiológico para o auxílio da recuperação dos COCs sob estereomicroscópio.

[0039] Todos os COCs recuperados após o *slicing* foram agrupados de acordo com a classificação recebida (grau I, grau II, grau III e degenerados) e, somente aqueles que obtiveram uma classificação grau I, grau II ou grau III foram vitrificados.

[0040] Os oócitos classificados como grau I foram aqueles circundados com três ou mais camadas de células do cumulus, com citoplasma escuro ou vesicular. Já os classificados como grau II e III foram aqueles que possuíam poucas células do cumulus, mas citoplasma escuro ou vesicular. Enquanto que os degenerados eram desnudos e possuíam alterações citoplasmáticas.

Protocolo de vitrificação do meio simples

[0041] Após o procedimento de *slicing* dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos em soro fisiológico, os oócitos foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo 3 gotas de 100 µL (cada) do meio desenvolvido. As duas primeiras gotas de 100 µL foram formadas por solução de equilíbrio, composta por álcool polivinílico, DMSO e etilenoglicol em meio base PBS. Os oócitos ficaram 30 segundos na primeira gota e depois 4 minutos na segunda gota, numa relação oócitos/meio de 10 oócitos/100 µL.

[0042] Em sequência, os oócitos foram transferidos para a terceira gota contendo solução de vitrificação, composta de álcool polivinílico, DMSO, etilenoglicol e sacarose em meio base PBS. Os oócitos permaneceram na terceira gota por 2 minutos e foram transferidos para a extremidade em bisel de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc com o auxílio de uma pipeta de 10 µL, ao mesmo tempo que se retirou a máxima quantidade possível de meio, deixando os oócitos com uma quantidade mínima de meio (figuras 1, 2 e 3).

[0043] A extremidade em bisel das hemi-palhetas foi mergulhada diretamente em nitrogênio líquido e não foi selada nem de forma mecânica ou de forma térmica. Após isso, as hemi-palhetas foram submergidas diretamente em nitrogênio líquido e colocadas em racks do botijão de nitrogênio líquido.

Formação do grupo controle

[0044] O grupo controle consistiu em oócitos frescos, recém-recuperados e que não foram submetidos à vitrificação. Após a recuperação dos oócitos, esses foram submetidos à coloração com o azul de tripan numa proporção de 100µL de soro fisiológico para 5µL de azul de tripan. Posteriormente, foram submetidos à avaliação em estereomicroscópio quanto a sua morfologia e viabilidade baseada no critério de permeabilidade da membrana plasmática.

Aquecimento e avaliação da morfologia e da viabilidade oocitária

[0045] Os oócitos foram aquecidos e os crioprotetores foram removidos de acordo com o protocolo desenvolvido para o meio simples de vitrificação contendo álcool polivinílico.

[0046] O protocolo consistiu, após ensaios prévios, em retirar as hemi-palhetas das racks do botijão de nitrogênio líquido com o auxílio de uma pinça anatômica e submergir a extremidade em bisel contendo os oócitos com o meio residual em uma gota de 100 µL contendo a solução de desvitrificação composta por PBS e 0,075M de sacarose por 3 minutos.

[0047] Em seguida, os oócitos foram removidos cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta e transferidos para a segunda gota de 100 µL durante 2 minutos, a qual continha apenas PBS.

[0048] Logo após, os oócitos foram transferidos para a terceira gota de 100 µL compreendendo PBS e azul de tripan, numa proporção de 5 µL de azul de tripan para cada 100 µL de PBS. Os oócitos permaneceram por 2 minutos nessa última gota e foram avaliados sob estereomicroscópio, bem como microscópio invertido quanto a aspectos morfológicos e coloração do citoplasma após exposição ao corante vital (figura 4). Dessa

forma, os oócitos foram agrupados em viáveis ou não viáveis de acordo com a permeabilidade da membrana plasmática.

Análise estatística

[0049] A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de chi-quadrado de Pearson no pacote SPSS. Diferenças consideradas significativas entre duas variáveis analisadas para o presente estudo foram aquelas com o $p < 0,05$.

Resultados

[0050] Após o aquecimento e avaliação morfológica sob estereomicroscópio e microscopia invertida com o azul de tripan, foi observado um total de 48 oócitos viáveis e 102 oócitos não viáveis, dos 150 oócitos desvitrificados. Dessa forma, 32% dos oócitos desvitrificados foram considerados viáveis (figura 5) e 68% dos oócitos desvitrificados foram considerados não-viáveis (figuras 6).

[0051] O grupo controle foi composto de 112 oócitos daqueles selecionados para o experimento, correspondendo a aproximadamente 20,74% do total de oócitos selecionados. Destes, 53 oócitos coraram com o azul de tripan e foram considerados não-viáveis e 59 oócitos permaneceram sem a coloração do azul de tripan. Logo, aproximadamente 47,32% dos oócitos foram considerados não-viáveis e aproximadamente 52,67% dos oócitos foram considerados viáveis.

[0052] Baseada nos aspectos morfológicos oocitários após coloração com o azul de tripan, a taxa de viabilidade oocitária do presente estudo mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (tabela 1). Entretanto, essa diferença significativa também é encontrada de modo vasto na literatura em diferentes espécies, visto que a técnica de vitrificação ainda não conseguiu superar alguns obstáculos para que consiga atingir o mesmo sucesso em relação à utilização de oócitos frescos (KUSHNIR *et al.* 2018; BONTE *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Viabilidade de oócitos felinos frescos e/ou vitrificados após coloração com azul de tripan.

	Total de oócitos	Oócitos viáveis	Oócitos não- viáveis
Oócitos frescos (grupo controle)	112	59 (52,67%) ^a	53 (47,32%) ^a
Oócitos vitrificados/aquecidos	150	48 (32%) ^b	102 (68%) ^b

*a, b: valores com diferenças significativas dentro das colunas da tabela.

[0053] É importante ressaltar que a taxa de viabilidade no presente estudo (32%) está próxima do espectro de taxa de viabilidade oocitária pós-vitrificação/desvitrificação para a espécie felina encontrada na literatura. Também é importante salientar que o presente meio foi desenvolvido com o intuito de ser um meio de vitrificação simples e reproduzível em diferentes localidades, eficaz, acessível para a maioria da realidade dos pesquisadores e sem o SFB. Por ser considerado um meio simples, a taxa de viabilidade com o meio do presente estudo é ligeiramente inferior ao encontrado na literatura, porém, ainda funcional.

[0054] Pesquisadores da área a respeito de biotécnicas reprodutivas para conservação de espécies considerarão os conhecimentos aqui apresentados como uma contribuição científica e poderão reproduzir o meio de vitrificação apresentado, caracterizado por ser simples, eficaz e acessível com a finalidade de ser utilizado para aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos felinos nas categorias expostas e em outras variantes, incluídas no escopo das reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

APPARICIO, M.; RUGGERI, E.; LUVONI, G.C. Vitrification of Immature Feline Oocytes with a Commercial Kit for Bovine Embryo Vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-7, 2012.

ARAYATHAN, S.; TIPTAVAVATANNA, N.; THARASANIT, T. Effects of vitrification and a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 inhibitor on the meiotic and developmental competence of feline oocytes. **J Reprod Dev**, vol. 63, n. 5, p. 511-517, out. 2017.

ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: where are we now? **Human Reproduction Update**, vol. 22, n. 4, p. 440-449, jul./ago. 2016.

- ASADA, M. *et al.* Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, vol. 58, n. 6, p. 1199-1208, out. 2002.
- BAGCHI, A.; WOODS, E.; CRISTER, J. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert Rev Med Devices**, vol. 5, n. 3, p. 359-370, maio 2008.
- BONTE, D. *et al.* Vitrification negatively affects the Ca²⁺-releasing and activation potential of mouse oocytes, but vitrified oocytes are potentially useful for diagnostic purposes. **Reproductive Biomedicine Online**, vol. 40, n. 1, p. 13-25, jan. 2020.
- CASTRO, S. V. *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- COCCHIA, N. *et al.* Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. **Cryobiology**, vol. 60, n. 2, p. 229-234, 2010.
- COLOMBO, M. *et al.* Granulosa cells in three-dimensional culture: A follicle-like structure for domestic cat vitrified oocytes. **Reproduction Domestic Animals**, vol. 00, p. 1-7, 2019.
- FAUSTINO, L. R. *et al.* Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, vol. 35, n. 1, p. 3-15, jan./mar. 2011.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, L.; JEWGENOW, K. Cryopreservation of feline oocytes by vitrification using commercial kits and slush nitrogen technique. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 52, n. S2, p. 230-234, 2017.
- GALIGUIS, J. *et al.* Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, vol. 68, n. 3, p. 459-466, 2014.
- HERRICK, J.; WANG, C.; MACHATY, Z. The effects of permeating cryoprotectants on intracellular free-calcium concentrations and developmental potential of in vitro-matured feline oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 28, p. 599-607, 2017.
- JANECKA, J. *et al.* Loss of Genetic Diversity among Ocelots in the United States during the 20th Century Linked to Human Induced Population Reductions. **PloS One**, vol. 9 n. 2, 26 fev. 2014.
- KENNEY, J. *et al.* How much gene flow is needed to avoid inbreeding depression in wild tiger populations?. **Proc Bio Sci**. vol. 281, n. 1789, 22 ago 2014.

KUSHNIR, V. A. *et al.* New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes. **Journal of Ovarian Research**, vol. 11, n. 2, jan. 2018.

LIMA, D. B. C. *et al.* Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, vol. 110, p. 110-115, 2018.

MACHADO, L. *et al.* Manutenção da Biodiversidade Brasileira através de bancos de germoplasma. **Pesq. Vet. Bras.** vol.36, n. 1, p. 62-66, jan. 2016.

MIKOLAJEWSKA, N. *et al.* Vitrification of Domestic Cat Oocytes – Effect on Viability and Integrity of Subcellular Structures. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 47, n. s6, p. 295-299, 2012.

MUNCK, N.; VAJTA, G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. **Cryobiology**, vol. 78, p. 119-127, out. 2017.

NAITANA, S. *et al.* Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, vol. 48, n.2-4, p. 247-256, 1997.

OCHOTA, M.; WOJTASIK, B.; NIZANSKI, W. Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoel cavity. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 52, n. S2, p. 281-287, 2017.

SANTIN, T.; BLUME, H.; MONDADORI, R. Criopreservação de embriões-metodologias de vitrificação. **Vet e Zootec**, vol. 16, n. 4, p. 561-574, dez 2009.

SOWINSKA, N. *et al.* Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after in vitro maturation and vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 52, n. 5, p. 806-813, 2017.

THARASANIT, T. *et al.* Successful pregnancy following transfer of feline embryos derived from vitrified immature cat oocytes using 'stepwise' cryoprotectant exposure technique. **Theriogenology**, vol. 76, n. 8, p. 1442-1449, 2011.

TURATHUM, B. *et al.* Missing and overexpressing proteins in domestic cat oocytes following vitrification and in vitro maturation as revealed by proteomic analysis. **Biological Research**, vol. 51, n. 1, p. 27, 2018.

VALK, J. *et al.* Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. **Alternatives to Animal Experimentation**, vol. 35, n. 1, p. 99-118, 2018.

REIVINDICAÇÕES

1. Meio de vitrificação para células germinativas femininas caracterizado por compreender etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose, adicionado de álcool polivinílico.
2. Meio, de acordo com a reivindicação 1, e por ser utilizado em oócitos.
3. Meio, de acordo com a reivindicação 2, e por ser utilizado em oócitos de animais da espécie felina.
4. Meio, de acordo com a reivindicação 1, e por compreender etilenoglicol em uma concentração de cerca de 7,5% a 15%.
5. Meio, de acordo com a reivindicação 4, e por compreender etilenoglicol em uma concentração de 15%
6. Meio, de acordo com a reivindicação 1, e por compreender álcool polivinílico numa concentração de cerca de 0,8% a 1,2%.
7. Meio, de acordo com a reivindicação 6, e por compreender álcool polivinílico numa concentração de 1%.
8. Meio, de acordo com a reivindicação 1, e por compreender dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 7,5% a 15%.
9. Meio, de acordo com a reivindicação 8, e por compreender dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 15%.
10. Meio, de acordo com a reivindicação 1, e por compreender sacarose em uma concentração de cerca de 0,1M a 0,5M.
11. Meio, de acordo com a reivindicação 10, e por compreender sacarose em uma concentração de cerca de 0,3M.

12. Processo de produção de meio para preservação de células germinativas femininas visto por compreender a etapa de adicionar álcool polivinílico ao dimetil sulfóxido, etilenoglicol e sacarose.
13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, e por ser utilizado em oócitos.
14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, e pelos oócitos serem provenientes de animais da espécie felina.
15. Processo, de acordo com a reivindicação 12, e por compreender etilenoglicol em uma concentração de cerca de 7,5% a 15%.
16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, e por compreender etilenoglicol em uma concentração de 15%.
17. Processo, de acordo com a reivindicação 12, e por compreender álcool polivinílico numa concentração de cerca de 0,8% a 1,2%.
18. Processo, de acordo com a reivindicação 17, e por compreender álcool polivinílico numa concentração de 1%.
19. Processo, de acordo com a reivindicação 12, e por compreender dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 7,5% a 15%.
20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, e por compreender dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 15%.
21. Processo, de acordo com a reivindicação 12, e por compreender sacarose em uma concentração de cerca de 0,1M a 0,5M.
22. Processo, de acordo com a reivindicação 21, e por compreender sacarose em uma concentração de cerca de 0,3M.
23. Processo de vitrificação de células germinativas femininas percebido por compreender a etapa de exposição dos oócitos a um meio constituído por

dimetilsulfóxido, etilenoglicol e sacarose adicionados ao álcool polivinílico seguido de vitrificação.

24. Processo, de acordo com a reivindicação 23, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por dimetil sulfóxido (DMSO) por um curto período de tempo.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 24, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por dimetil sulfóxido (DMSO) por cerca de 2 minutos.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 23, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 7,5% a 15%.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 26, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração de cerca de 15%.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 23, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por etilenoglicol em uma concentração de 7,5% a 15%.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 28, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por etilenoglicol em uma concentração de 15%.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 23, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por álcool polivinílico em uma concentração de cerca de 0,8 a 1,2%.

31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, e por compreender a etapa de exposição das células a um meio constituído por álcool polivinílico em uma concentração de cerca de 1%.

32. Processo, de acordo com a reivindicação 23, e por ser utilizado em oócitos.
33. Processo, de acordo com a reivindicação 32, e ser utilizado em oócitos provenientes da espécie felina.