

PRUEBA DE CONCEPTO PARA EL USO DE MEDIOS DE CULTIVO EN FORMATO SECO EN LA DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

Juan¹, A., Masegosa¹, A., Romero-Aguirregomezcorta^{2,3}, J., Coy^{2,3}, P. y Romar^{2,3}, R.

¹EmbryoCloud SL, Murcia, España; ²Dept. Fisiología. Universidad de Murcia; ³IMIB-Arrixaca *rromar@um.es

INTRODUCCIÓN

La vitrificación de embriones bovinos es una técnica en constante aumento. En el año 2021 más del 30% de los embriones transferidos habían sido previamente vitrificados (Viana, 2022). Los medios de cultivo utilizados para el proceso de vitrificación y calentamiento cuentan con una formulación consolidada partiendo siempre de medios stock en formato líquido (Vajta *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2017). En reproducción asistida, el uso de medios de cultivo en formato seco presenta ventajas tanto en aspectos de conservación como de transporte y se comercializan para diversas técnicas de reproducción asistida, aunque su uso en la descongelación de embriones no se ha reportado. El objetivo de este estudio es validar de forma preliminar un set de medios de cultivo en formato seco (lío-filizados), y libres de suero fetal bovino, para la descongelación de embriones bovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La producción *in vitro* de embriones bovinos se realizó a partir de ovarios de matadero (Lopes *et al.*, 2019) utilizando medios de cultivo en formato seco (EmbryoCloud, Murcia, España). Los blastocistos expandidos obtenidos a día 7 y día 8 post-inseminación se vitrificaron utilizando el método Cryotop (Morató *et al.*, 2010) con medios en formato líquido conteniendo dimetilsulfóxido, etilenglicol y sacarosa como crioprotectores. Una vez vitrificados, los embriones se mantuvieron en nitrógeno líquido un mes antes de proceder a su calentamiento. Los embriones del grupo CONTROL se calentaron empleando los medios y el protocolo descritos por Martínez-Rodero *et al.* (2024) y los del grupo DRY se calentaron con el mismo protocolo y medios de cultivo, pero preparados con los componentes en formato liofilizado. Para el calentamiento, se sumergieron los embriones en el medio conteniendo 1M de sacarosa a 38°C, se realizaron dos lavados, de 3 y 5 minutos, con concentraciones descendentes de sacarosa (0,5M y 0M respectivamente) y se introdujeron en medio de cultivo durante 24 horas a 38,5°C, 5% CO₂ y 5% O₂. La reexpansión y eclosión de los blastocistos se evaluó a las 3 y 24 horas de cultivo y el número total de células se determinó mediante fijación y tinción con Hoechst. Se realizaron 3 réplicas con un total de 43 embriones por grupo. Los resultados de reexpansión y eclosión embrionaria se analizaron con la prueba de chi-cuadrado y para el número de células se empleó la prueba t de Student, utilizando R como software estadístico. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM y se consideraron diferencias significativas $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia embrionaria fue similar en ambos grupos, siendo la reexpansión a las 3 horas de 57,0 $\pm$ 6,6% para el grupo CONTROL y de 65,3 $\pm$ 1,3% para el grupo DRY. A las 24 horas post-calentamiento se alcanzó un 77,4 $\pm$ 3,5% de reexpansión y 32,3 $\pm$ 10,5% de eclosión en el grupo CONTROL, y un 69,3 $\pm$ 2,6% de reexpansión y 40,6 $\pm$ 7,3% de eclosión en el grupo DRY. En cuanto al número medio de células, los blastocistos vitrificados a día 7 en el grupo CONTROL tuvieron un menor número de células (115,4 $\pm$ 10,8) que los del grupo DRY (158,4 $\pm$ 10,0) ($P = 0,012$). El número de células fue similar entre grupos para los embriones vitrificados a día 8 (107,3 $\pm$ 10,2 CONTROL y 133,8 $\pm$ 19,1 DRY).

CONCLUSIÓN

Los medios de descongelación embrionaria en formato seco son una opción válida para realizar el proceso de calentamiento alcanzando porcentajes de reexpansión y eclosión similares a los que se alcanzan con los medios líquidos convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gómez *et al.* 2017. *Reprod Fertil Dev*. 29: 1932-1943.
- Lopes *et al.* 2019. *Theriogenology*. 126: 222-229.
- Martínez-Rodero *et al.* 2024. *Reproduction*. 167: e240036.
- Morató *et al.* 2010. *Reprod Fertil Dev*. 22: 1141-1147.
- Vajta *et al.* 1998. *Mol Reprod Development* 51(1): 53-58.
- Viana. 2022. *Embryo Technology Newsletter*. 40: 22-40.

Agradecimientos: Este estudio es parte del proyecto 22247/PDC/23 financiado por la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.