

IMPACTO DE LA TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN A LA SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO DURANTE LA VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS BOVINOS

Díaz-Muñoz*, J., Martínez-Rodero, I., García-Martínez, T. y Mogas, T.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España

*judit.diaz@uab.cat

INTRODUCCIÓN

A pesar de la gran importancia de la vitrificación de blastocistos en la industria de la transferencia de embriones bovinos, los protocolos utilizados varían considerablemente en cuanto a la temperatura y tiempo de exposición a la solución de equilibrio. Cuando se analizó el comportamiento osmótico y la permeabilidad de membrana al agua y a los crioprotectores de blastocistos expandidos obtenidos a día 7 de cultivo *in vitro*, resultados previos obtenidos en nuestro grupo sugirieron dos predicciones matemáticas para el tiempo óptimo de exposición de los blastocistos a la solución de equilibrio a dos temperaturas, 25 °C y 38,5 °C (Díaz-Muñoz *et al.*, 2022). El objetivo de este estudio fue probar los dos protocolos de vitrificación obtenidos mediante modelización matemática con un tiempo de exposición específico para cada temperatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para determinar la precisión de las predicciones matemáticas al modelo *in vitro*, blastocistos bovinos producidos *in vitro* tras 7 días de cultivo y en estadio expandido se expusieron a la solución de equilibrio (7,5 % dimetilsulfóxido y 7,5 % de etilenglicol en TCM199-Hepes con 20 % de suero fetal bovino) a 25 °C y 38,5 °C, registrando los cambios volumétricos de los embriones mediante *Time-Lapse*. Los resultados indicaron que el tiempo necesario para que el blastocisto recuperara su volumen inicial era de 8 min a 25 °C y 3 min y 50 s a 38,5 °C. A continuación, se vitrificaron/calentaron blastocistos expandidos a día 7 de cultivo por el método Cryotop (Martínez-Rodero *et al.*, 2021) exponiéndolos a la solución de equilibrio durante 8 min a 25 °C (VIT 25; n = 49) o durante 3 min 50 s a 38,5 °C (VIT 38,5; n = 51). Como control se utilizaron blastocistos no vitrificados (C; n = 44). A las 24 h de la l calentamiento, se calcularon los porcentajes de re-expansión y eclosión. Los blastocistos que sobrevivieron a la vitrificación/calentamiento se fijaron para su tinción con SOX2 Monoclonal Antibody para el recuento de las células de la masa celular interna, Caspasa 3 para el índice de apoptosis y DAPI para el recuento total de células. La captura de imágenes se realizó con un microscopio confocal Leica TCS SP5 y el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software Imaris 9.2. El porcentaje de supervivencia y eclosión, el recuento celular total, el recuento de las células de la masa celular interna y el índice de apoptosis se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. La significancia se estableció en $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron porcentajes de re-expansión (100 %, $86,2 \pm 6$ % y $93,1 \pm 2,9$ % respectivamente) y de eclosión ($32,4 \pm 2,3$ %, $24,3 \pm 5,1$ % y $38,1 \pm 2,8$ %, respectivamente) similares entre el grupo control y los grupos VIT 25 y VIT 38,5. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de re-expansión entre los grupos VIT 25 y VIT 38,5, pero el porcentaje de eclosión fue superior para el grupo VIT 38,5. Contrariamente, Do *et al.* (2017) no observaron diferencias significativas en re-expansión o eclosión cuando vitrificaron blastocistos bovinos tras su exposición a solución de equilibrio durante 8 min a 25 °C o 3 min a 37 °C. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos cuando se valoró el recuento celular total, el número de células de la masa celular interna o el índice apoptótico.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de exposición a la solución de equilibrio de 3 min y 50 s parece mejorar la calidad de los blastocistos bovinos expandidos a día 7 de cultivo aumentando su capacidad de eclosión tras su vitrificación/calentamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Díaz-Muñoz, J. *et al.* Reproduction, Fertility and Development 35(2): 151-151 • Martínez-Rodero, I. *et al.* 2021. Biology 10: 142 • Do, V.H. *et al.* 2017. Cryobiology 77: 58-63.

Agradecimientos: Este trabajo se a realizado con fondos del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto PID2020-116531RB-I00 y beca PRE2021-098675).