

R-111 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 245-246, 2023, <https://doi.org/10.52973/rfcv-wbc097>**Ovarian stimulation alternatives for *in vitro* production of embryos in water buffaloes****Bandeo, Alexis^{1,2}; Konrad, José Luis^{1,2}; Vallejos, Natalia¹; Ponce, Pablo^{1,2}; Sansinena, Marina J.^{2,4,5}; Crudeli, Gustavo⁶; Maldonado-Vargas, Pablo¹**¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina.²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.³Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina⁴Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad del Salvador⁵Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS).*Corresponding author: Bandeo, Alexis
(bandeoalexissebastian@gmail.com).**ABSTRACT**

Currently, one of the most promising tools to increase the number of transferable embryos in buffaloes is *in vitro* production (IVP). However, IVP still has certain limitations that prevent its optimal efficiency for commercial application. One of these limitations is the reduced number and low competence of oocytes obtained from transvaginal follicular aspiration in this species. It has been found that ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone (FSH) before aspiration improves the technique's efficiency, primarily due to the increased competence of the obtained oocytes. The objective of this study was to evaluate the response to different hormonal stimulation treatments in buffalo donors, their effect on oocyte quality, and subsequent embryo production. This field study was conducted at the Pedro Antonio Silva buffalo farm, located in the General Paz department, Province of Corrientes, in 2021. A total of 60 OPU sessions were performed on Murrah and Mediterranean breed donors, and four ovarian stimulation treatments were applied. Treatment (TRT) 1, which was used as control (n=20), consisted of a day 0 insertion of an intravaginal progesterone device (IP) + 2 mg estradiol benzoate (EB) i.m., with OPU performed on day 7. Treatment (TRT) 2 (n=10) consisted of day 0 insertion of IP + 2 mg EB, followed by four applications of FSH (Folltropin-V®) i.m. with a total of 160 mg distributed in decreasing doses every 12 hours for two days (50mg, 50mg, 30mg, 30mg), OPU was then performed 36 hours after the last application. Treatment (TRT) 3 (n=20) consisted of day 0 insertion of IP + EB, followed by a day 4 application of 1050 IU of recombinant eCG (FoliRec®) i.m., OPU was performed on day 7; Treatment (TRT) 4 (n=10) consisted of day 0 insertion of IP + EB, followed by day 4 application of 2500 IU of serum eCG (Ecegon®) i.m., OPU was performed 72 hours later. Prior

Alternativas de estimulación ovárica para la producción *in vitro* de embriones en búfalas de agua**Bandeo, Alexis^{1,2}; Konrad, José Luis^{1,2}; Vallejos, Natalia¹; Ponce, Pablo^{1,2}; Sansinena, Marina J.^{2,4,5}; Crudeli Gustavo⁶; Maldonado-Vargas, Pablo¹**¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina.²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.³Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina⁴Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad del Salvador⁵Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS).*Autor de correspondencia: Bandeo, Alexis
(bandeoalexissebastian@gmail.com).**RESUMEN**

Actualmente, una de las herramientas más prometedoras para aumentar el número de embriones transferibles en búfalas es la producción *in vitro* (PIVE). Sin embargo, la PIVE todavía tiene ciertas limitaciones que limitan su eficiencia para aplicaciones comerciales. Una de estas limitaciones es el número reducido y la baja competencia de los ovocitos obtenidos de la aspiración folicular transvaginal en esta especie. Se ha descubierto que la estimulación ovárica con hormona folículo estimulante (FSH) antes de la aspiración mejora la eficacia de la técnica, principalmente debido a la mayor competencia de los ovocitos obtenidos. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta a diferentes tratamientos de estimulación hormonal en donantes bufalinas, su efecto sobre la calidad de los ovocitos y la posterior producción de embriones. Este estudio de campo se realizó en el criadero de búfalos Pedro Antonio Silva, ubicado en el departamento General Paz, Provincia de Corrientes, durante el año 2021. Se realizaron un total de 60 sesiones de OPU a donantes de raza Murrah y Mediterránea, y cuatro tratamientos de estimulación ovárica se aplicaron. El tratamiento (TRT) 1, que se utilizó como control (n=20), consistió en la inserción el día 0 de un dispositivo de progesterona intravaginal (IP) + 2 mg de benzoato de estradiol (EB) por vía intramuscular, y la OPU se realizó el día 7. Tratamiento (TRT) 2 (n=10) consistió en la inserción del día 0 de IP + 2 mg de EB, seguida de cuatro aplicaciones de FSH (Folltropin-V®) i.m. con un total de 160 mg distribuidos en dosis decrecientes cada 12 horas durante dos días (50 mg, 50 mg, 30 mg, 30 mg), luego se realizó OPU 36 horas después de la última aplicación. El tratamiento (TRT) 3 (n=20) consistió en la inserción de IP + EB el día 0, seguida de una aplicación el día 4 de 1050 UI de eCG recombinante (FoliRec®) i.m., la OPU se realizó el día 7; El tra-

to each follicular aspiration, antral follicles were counted using a portable ultrasound with a linear probe (Mindray, DP30-Vet) and classified into small (≥ 3 mm $\varnothing$), medium (4-8 mm $\varnothing$), and large (> 8 mm $\varnothing$) follicles. The aspirated oocytes or COCs (cumulus-oocyte complexes) were classified into grades (1 to 4) based on the number of cumulus layers present, according to the International Embryo Transfer Society method (IETS Manual). *In vitro* fertilization (IVF) was performed after 24 hours of oocyte *in vitro* maturation using cryopreserved semen from buffalo bulls of proven fertility. *In vitro* culture (IVC) was carried out for 6.5 days, and all embryos that reached the blastocyst stage were graded and vitrified. Descriptive statistics and analysis of variance were conducted on the obtained data, considering population and follicular size, quantity and quality of oocytes, and embryo production, with a significance level (α) of 5%. The total observed follicular population did not differ among treatments ($p > 0.05$). However, stimulation in TRT2 (FSH) and TRT4 (serum eCG) increased the proportion of medium-sized follicles (4-8 mm) available for OPU ($p < 0.05$), which correlates with better quality. In comparison, the control group had the highest number of small follicles (< 3 mm). The number of collected oocytes per OPU did not vary between treatments ($p > 0.05$). Regarding oocyte quality, TRT2 (FSH) and TRT4 (serum eCG) resulted in a higher quantity of grade 1 oocytes ($p < 0.05$). *In vitro* embryo production was higher in TRT2 (1.5 embryos/buffalo/OPU), followed by TRT3 (1.05 embryos/buffalo/OPU), and lower in TRT4 and TRT1 (0.8 and 0.6 embryos/buffalo/OPU, respectively) ($p < 0.05$). No significant difference was found in the number of zygotes (CIV) between treatments ($p < 0.05$), and cleavage was higher in TRT3 ($p < 0.05$). In conclusion, this study has shown that ovarian super stimulation before OPU increases the proportion of medium-sized follicles available for the aspiration procedure, resulting in a higher proportion of viable oocytes. This effect is mainly achieved using FSH and serum eCG. Stimulation with FSH also resulted in higher rates of blastocysts and embryos produced per OPU session. These are promising for the advancement of the OPU/IVP technique in water buffaloes. Further work is needed to optimize the outcomes, especially with these new ovarian stimulation alternatives.

Keywords: buffalo, stimulation, follicular aspiration, *in vitro*, embryo.

tamiento (TRT) 4 ($n=10$) consistió en la inserción del día 0 de IP + EB, seguida de la aplicación del día 4 de 2500 UI de eCG sérico (Ecegon®) por vía intramuscular; la OPU se realizó 72 horas después. Antes de cada aspiración folicular, los folículos antrales se contaron mediante un ultrasonido portátil con sonda lineal (Mindray, DP30-Vet) y se clasificaron en pequeños (≥ 3 mm $\varnothing$), medianos (4-8 mm $\varnothing$) y grandes (> 8 mm $\varnothing$) folículos. Los ovocitos aspirados o COCs (complejos cúmulo-ovocito) se clasificaron en grados (1 a 4) según el número de capas de cúmulo presentes, según el método de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Manual IETS). La fertilización *in vitro* (FIV) se realizó después de 24 horas de maduración *in vitro* de ovocitos utilizando semen criopreservado de toros bufalinos de fertilidad comprobada. Se realizó cultivo *in vitro* (CIV) durante 6,5 días y todos los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fueron clasificados y vitrificados. A los datos obtenidos se les realizó estadística descriptiva y análisis de varianza, considerando tamaño poblacional y folicular, cantidad y calidad de ovocitos y producción de embriones, con un nivel de significancia (α) del 5%. La población folicular total observada no difirió entre tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, la estimulación en TRT2 (FSH) y TRT4 (eCG sérica) aumentó la proporción de folículos de tamaño mediano (4-8 mm) disponibles para OPU ($p < 0.05$), lo que se correlaciona con una mejor calidad. En comparación, el grupo de control tuvo la mayor cantidad de folículos pequeños (< 3 mm). El número de ovocitos recolectados por OPU no varió entre tratamientos ($p > 0.05$). En cuanto a la calidad de los ovocitos, TRT2 (FSH) y TRT4 (eCG sérica) resultaron en una mayor cantidad de ovocitos grado 1 ($p < 0.05$). La producción de embriones *in vitro* fue mayor en TRT2 (1,5 embriones/búfalo/OPU), seguida de TRT3 (1,05 embriones/búfalo/OPU), y menor en TRT4 y TRT1 (0,8 y 0,6 embriones/búfalo/OPU, respectivamente) ($p < 0.05$). No se encontró diferencia significativa en el número de cigotos (CIV) entre tratamientos ($p < 0.05$), y la escisión fue mayor en TRT3 ($p < 0.05$). En conclusión, este estudio ha demostrado que la superestimulación ovárica antes de la OPU aumenta la proporción de folículos de tamaño mediano disponibles para el procedimiento de aspiración, lo que resulta en una mayor proporción de ovocitos viables. Este efecto se logra principalmente utilizando FSH y eCG sérico. La estimulación con FSH también resultó en tasas más altas de blastocistos y embriones producidos por sesión de OPU. Estos son prometedores para el avance de la técnica OPU/IVP en búfalos de agua. Se necesita más trabajo para optimizar los resultados, especialmente con estas nuevas alternativas de estimulación ovárica.

Palabras clave: búfalo, estimulación, aspiración folicular, *in vitro*, embrión.