

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA MEDIANTE FSH (FOLLTROPIN®) Y RENDIMIENTO DE OPU EN VACAS ADULTAS OBTENIDAS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Response to ovarian stimulation by FSH (Folltropin®) and yield of OPU in adult heifers obtained by different assisted reproduction techniques

Morera-Jiménez A., Velasco-García E., Heras S., Romero-Aguirregomez Corta J., Ruiz S.

Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria, Complejo Espinardo. 30100. Universidad de Murcia. Murcia. España.

Autor para correspondencia: Ruiz S.: sruiz@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado

Enviado: 11 Agosto 2022

Aceptado: 12 Septiembre 2022

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo han sido realizar un seguimiento ecográfico de los ovarios bovinos para comprobar la respuesta folicular de vacas adultas nacidas por diferentes técnicas de reproducción asistida (TRA), tras aplicar un protocolo de estimulación ovárica con FSH (Folltropin®); y determinar la eficacia reproductiva de los animales estudiados, analizando la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular (*Ovum Pick-Up*, OPU) antes y después del protocolo de estimulación empleado.

La experiencia se ha llevado a cabo en las instalaciones del santuario bovino de la Granja Docente Veterinaria de la Universidad de Murcia. Se han utilizado 4 hembras bovinas obtenidas por distintas TRA: inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE) producidos por TRA con ovocitos cultivados *in vitro* en medios convencionales y por TE obtenidos por TRA con ovocitos cultivados con fluidos naturales (folicular y oviductal).

Los animales fueron estimulados durante 5 semanas mediante un protocolo que consistía en la aplicación de GnRH y posteriormente, FSH (Folltropin®, 350 UI/animal) durante 3 días en dosis decrecientes. Una vez

a la semana, al finalizar el protocolo de estimulación ovárica, se realizaba una ecografía de los ovarios y una aspiración folicular ecoguiada (OPU) para comprobar la respuesta al protocolo de estimulación y determinar el número de folículos y de ovocitos obtenidos tras la OPU y su calidad ovocitaria. Previamente al periodo de estimulación con FSH, las vacas fueron ecografiadas y sometidas a OPU 3 semanas sin estimulación ovárica como grupo control.

A lo largo del trabajo realizado, se ha comprobado la respuesta al protocolo de estimulación ovárica ensayado, y se ha determinado la eficacia reproductiva de los animales, según el número de folículos aspirados y la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU en cada una de ellas.

Palabras clave: vaca, ecografía, FSH, OPU, folículos, ovocitos.

ABSTRACT

The aims of this study were to perform an ultrasound monitoring of bovine ovaries to check the follicular response of adult heifers born by different assisted reproduction techniques (ARTs), after applying an ovarian stimulation protocol with FSH (Folltropin®); and determine the reproductive efficiency of the animals included in the study, analyzing the quantity and quality of the oocytes obtained by ultrasound guided follicular aspiration (Ovum Pick-Up, OPU) before and after the stimulation protocol used.

The experiment was performed in the facilities of the bovine sanctuary of the Veterinary Teaching Farm of the University of Murcia. The four heifers included in the study were obtained by different ARTs: 1) artificial insemination (AI) and, 2) embryo transfer. The embryos used for ET were either produced *in vitro* in either conventional media or in media supplemented with natural fluids (follicular and oviductal).

The animals were stimulated for 5 weeks by means of a protocol that consisted of the administration of GnRH and later, FSH (Folltropin®, 350 IU/animal) for 3 days in decreasing doses. Once a week, at the end of the ovarian stimulation protocol, an ultrasound exam of the ovaries and an OPU were performed to check the response to the stimulation protocol and to determine the number of follicles and oocytes obtained after the OPU and their quality. Prior to the stimulation with FSH, the cows were echographed and underwent OPU for 3 weeks without ovarian stimulation as a control group.

In this study, we were able to evaluate the response to the ovarian stimulation protocol tested, and to determine the reproductive efficiency of the animals in terms of the number of follicles aspirated, the quantity and the quality of the oocytes obtained by OPU.

Keywords: bovine, ultrasonography, FSH, OPU, follicles, oocytes.

INTRODUCCIÓN

En la vaca, el primer parto acontece sobre los 24 meses de edad. Un retraso en la edad al primer parto supone un impacto económico negativo para las explotaciones bovinas (Ball & Peters, 2004). Además, el número de partos por vaca influye en la productividad de las hembras reproductoras y en la rentabilidad de las explotaciones.

El intervalo entre partos en el ganado bovino es de un año, dicho periodo se puede reducir usando técnicas de reproducción asistida (TRA) como son, entre otras, la inseminación artificial (IA), la punción folicular eco-guiada

(*Ovum Pick-Up*, OPU), y la transferencia de embriones (TE) producidos *in vivo*, mediante lavado uterino, o producidos *in vitro*, mediante técnicas de maduración, fecundación y cultivo embrionario. Las TRA sirven además de paliar problemas reproductivos, para gestionar el programa reproductivo de las explotaciones ganaderas (Hansen, 2020).

La vaca es un mamífero políestrico con un ciclo estral que dura de 21 a 22 días. El celo puede durar de 2 a 50 h, siendo de 12 a 18 h el promedio de duración. El día del estro, se considera el día 0 y la ovulación ocurre de 24 a 30 h después del inicio del estro o el día 1 del ciclo (Senger, 2005).

El ciclo estral ocurre como resultado de cambios repetidos en el desarrollo folicular en los ovarios, ovulación y formación del cuerpo lúteo (CL). Todo ello, controlado por la interacción de hormonas secretadas por hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropina, GnRH), hipófisis (hormona foliculoestimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), ovarios (progesterona, P4, estradiol, E2 e inhibinas) y útero (prostaglandina F2 α , PGF2 α) (Forde, Beltman, Lonergan, Diskin, Roche & Crow, 2011). Estas hormonas controlan el ciclo estral mediante un sistema de retroalimentación positiva y negativa (Roche, 1996).

El ciclo estral de la vaca se divide en dos etapas: la fase folicular y la luteal. En la primera hay dominancia de estructuras foliculares en el ovario, que producen elevadas concentraciones de E2. En la vaca está conformada por el proestro y el estro. En la fase luteal existe un CL maduro o inmaduro en el ovario, que produce P4, y la conforman el metaestro y el diestro (Lenis, Tamayo, Rodríguez, Duque, Naranjo, Carrillo & Tarazona, 2014).

Durante el estro los niveles sanguíneos de E2 producidos por el folículo preovulatorio llegan a su máxima concentración. Dura de 12 a 18 h. En el metaestro, se da la ovulación del folículo preovulatorio dominante y los niveles de E2 disminuyen para comenzar a aumentar la producción de P4. Tiene una duración de 3 a 4 días. El diestro se inicia con la presencia de un CL funcional, que hace aumentar los niveles de P4, con el fin de mantener la gestación. Si la vaca queda gestante el CL será funcional hasta unos días antes del parto, de lo contrario, el CL sufrirá una lisis por acción de PGF2 α entre los días 15 y 17 del ciclo. El diestro tiene una duración de 10 a 12 días. Por último, en el proestro se produce un aumento gradual de los niveles de E2, producidos por el folículo dominante, con una duración de 3 a 5 días (Lenis et al., 2014).

Durante la fase folicular del ciclo estral existen niveles basales de P4 debido a la regresión del CL. El aumento de los E2, derivado de

la rápida proliferación del folículo dominante preovulatorio, concomitante con la disminución de las concentraciones circulantes de P4, induce un aumento de GnRH y permite la visualización del celo conductual.

Tras el transporte de GnRH desde el hipotálamo hasta la hipófisis, la GnRH se une a su receptor acoplado a proteína G en la superficie celular de las células gonadotropas (Kakar, Rahe & Neill, 1993), unión que culmina en la liberación de FSH y LH de sus compartimentos de almacén (Weck, Fallest, Pitt & Shupnik, 1998). Cuando las concentraciones séricas de P4 son basales y ocurren pulsos de LH durante 2 a 3 días cada 40 a 70 min, el folículo dominante preovulatorio ovula, y a la ovulación le sigue la fase luteal del ciclo estral (Forde et al., 2011).

La fase luteal se caracteriza por la formación del CL a partir del folículo ovulado colapsado (cuerpo hemorrágico). Debido a la formación del CL en las células de la granulosa y la teca del folículo dominante preovulatorio ovulado, la concentración de P4 empieza a aumentar en preparación para establecer y mantener la gestación o para la reanudación del ciclo estral (Forde et al., 2011).

Durante el diestro, las concentraciones de P4 siguen siendo elevadas y se producen ondas de liberación de FSH de la adenohipófisis, aunque éstas son insuficientes para provocar la ovulación del folículo dominante preovulatorio. Finalmente, durante el proestro, las concentraciones de P4 disminuyen al lisarse el CL debido a la acción de la PGF2 α (Forde et al., 2011).

En el ciclo estral de la vaca ocurren dos, tres y hasta cuatro ondas de crecimiento folicular (Ginther, Knopf & Kastelik, 1993; Fortune, 1994). La aparición de la primera onda folicular coincide con el día de la ovulación (día 0). La aparición del resto de ondas foliculares varía en cuestión del número de ondas que tenga el ciclo estral (Adams, Jaiswal, Singh & Malhi, 2008).

La aparición de una onda folicular está precedida por un aumento en las concentraciones

plasmáticas de FSH, lo que provoca el rápido crecimiento de varios folículos (Nebel & De-Jarnette, 2011). Los productos foliculares, especialmente el folículo dominante, son los encargados de suprimir la liberación de FSH y, por tanto, la aparición de la siguiente onda folicular. Cada una de estas ondas foliculares, incluyen folículos de ambos ovarios. Solo un folículo se selecciona para convertirse en el dominante, esta selección se asocia con la disminución de la concentración de FSH en sangre durante los 3 primeros días de la onda (Adams et al., 2008).

El folículo dominante tiene la capacidad de restringir el crecimiento de todos los demás folículos presentes en los ovarios. En el intervalo de 3 a 6 días, el folículo dominante ovula o entra en regresión. La desaparición del folículo dominante coincide con la formación de la siguiente onda folicular, de la cual saldrá otro folículo dominante (Nebel et al., 2011).

A continuación, revisaremos los principales procedimientos de **estimulación hormonal ovárica** empleados en la especie bovina.

Un primer protocolo consiste en el uso combinado de FSH y de gonadotropina coriónica humana (hCG). El día 6 después de iniciarse el ciclo estral, se aplican 6 dosis de FSH administradas cada 12 h. Posteriormente, debemos someter las vacas a un periodo de privación de FSH llamado "*coasting period*" que durará 48 h. Por último, 6 h antes de la OPU, debemos administrar una dosis de hCG a cada animal (Giraldo, Ordoñez, Gómez & Restrepo, 2017).

El uso de GnRH y FSH consiste en administrar GnRH a los animales y 36 h después, aplicar FSH; 24 h más tarde, se llevará a cabo la OPU (Billón, Sena, Aguilar & Ruiz, 2018).

El uso combinado de E2 y P4 consiste en la administración de 5-2,5 mg de estradiol-17 β o 2 mg de benzoato de estradiol y 100-50 mg de P4 vía intramuscular (i.m.) en el momento de la inserción de un dispositivo liberador de P4 intravaginal (Bó, Guerrero, Tríbulo, Tríbulo, Rogan & Mapletoft, 2010; Mapletoft & Bó, 2013). Cuatro días después de este tratamiento y du-

rante 4 días, se inyecta FSH vía i.m. 8 veces. La PGF2 α se administra con las inyecciones 5^a y 6^a de FSH y el dispositivo de P4 se retira con la 6^a inyección (Mapletoft & Bó, 2013).

Para realizar el protocolo P-36 se coloca un dispositivo liberador de P4 y se deja colocado hasta 36 h después de la administración de PGF2 α y se induce la ovulación mediante la administración de LH exógena (o GnRH), 12 h después de retirar el dispositivo de P4, 48 h tras la administración de PGF2 α (Mapletoft & Bó, 2013). Sin embargo, el uso de E2 está restringido en la Unión Europea, EEUU y Nueva Zelanda, por lo que actualmente, no podríamos realizar los dos protocolos anteriormente descritos (Mapletoft & Bó, 2013).

La ablación de folículos se propone como alternativa a los protocolos que requieren el uso de E2. Consiste en eliminar el efecto supresor del folículo dominante mediante la aspiración ecoguiada del folículo e iniciar el tratamiento de estimulación ovárica 1 o 2 días después (Bó et al., 2010).

También podemos usar una única administración de FSH i.m. para lo que combinaremos el extracto pituitario de FSH con agentes que hagan que la hormona se libere lentamente durante varios días. Estos agentes se conocen como polímeros y son biodegradables y no reactivos (Mapletoft & Bó, 2011). La FSH en una solución de 30% de polivinilpirrolidona (PVP) y administrada en una sola inyección vía i.m. provoca una respuesta superovulatoria comparable a los tratamientos dos veces al día (Bó et al., 2010).

La administración de una única inyección subcutánea (s.c.) de la dosis acumulada total de FSH provoca una respuesta superovulatoria equivalente a la de un protocolo de inyección i.m. de FSH dos veces al día, durante 4 días. Hay que asegurarse que la inyección se haga vía s.c. y en una almohadilla de grasa, detrás del hombro o en el cuello (Mapletoft & Bó, 2011).

El uso de una dosis única dividida en 2 inyecciones de FSH consiste en realizar 2 inyec-

ciones i.m. de FSH en 5 mg/ml o 10 mg/ml de ácido hialurónico separadas 48 h, lo que induce una respuesta superovulatoria y una producción de ovocitos y/o embriones que no difiere de las inyecciones i.m. dos veces al día, durante 4 días (Mapletoft & Bó, 2011).

Por último, el uso combinado de FSH y eCG consiste en superestimular durante 3 días con FSH y el 4º día, realizar 2 inyecciones de 200 UI de eCG. Este protocolo también se puede realizar estimulando con inyecciones de FSH dos veces al día durante 4 días e inyectando 400 UI de eCG tras 4 inyecciones de FSH (Mapletoft & Bó, 2011).

La **ultrasonografía** es una técnica diagnóstica basada en la recepción de los ultrasonidos que emite una sonda o transductor. Los ultrasonidos atraviesan la zona que queremos explorar hasta cierta profundidad, aprovechando la diferente velocidad de propagación de los tejidos para transformar en impulsos eléctricos las señales que llegan y poder visualizarlos en una pantalla en diferentes tonos de gris (Díaz, Garrido & Castellano, 2007).

El transductor es el elemento encargado de transformar la energía eléctrica en energía acústica y viceversa, gracias al efecto piezoeléctrico. Existen distintos tipos de transductores, pero, en nuestro caso, para la realización de exámenes reproductivos en bovinos se suele utilizar una sonda lineal por vía endorrectal, para examinar útero, ovarios y para el diagnóstico temprano de gestación (DesCôteaux, Gnemmi & Colloton, 2009).

Según los ecos que generan los ultrasonidos, podemos clasificar las distintas estructuras que se visualizan en el ecógrafo en: hiperecogénicas o hiperecoicas, aquellas que generan ecos en gran cantidad y/o intensidad, visualizándose como imágenes blanco intenso. Estructuras hipocogénicas o hipococicas que generan pocos ecos y/o de baja intensidad, se observan como imágenes de color gris oscuro. Una estructura isoecogénica o isoecoica presenta la misma ecogenicidad que otra y ecográficamente, po-

demus ver una imagen gris-blanca. Por último, una estructura anecogénica o anecoica no genera ecos al no haber interfases en su interior y se observa como una imagen de color negro intenso (DesCôteaux et al., 2009).

Los ovarios bovinos son órganos dinámicos que producen folículos anovulatorios y ovulatorios y forman CLs a intervalos regulares. Para identificar vacas en celo, el veterinario deberá además de la revisión ecográfica para visualizar un posible folículo dominante de más de 12-15 mm de diámetro, interpretar otros signos, como cambios en la ecotextura y tono uterino, secreciones endometriales y de moco vaginal y cambios de comportamiento (DesCôteaux et al., 2009).

Los aparatos de ultrasonidos portátiles utilizados en campo permiten, a partir del tercer o cuarto día del ciclo estral, identificar el contorno de los CLs jóvenes. A medida que los CLs envejecen, se va volviendo más hiperecogénicos en comparación con el estroma ovárico circundante. Cabe destacar que, entre el 30% y el 50% de los CLs, durante los primeros 10 días del ciclo estral, presentan una cavidad anecogénica central, se denominan CLs cavitarios (DesCôteaux et al., 2009).

La técnica de **Ovum Pick-Up** (OPU) tiene como objetivo obtener ovocitos inmaduros de vacas genéticamente superiores preseleccionadas, mediante la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido. El proceso se completa con la maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos obtenidos y el cultivo *in vitro* de los embriones hasta la etapa de mórula o blastocisto, para que puedan ser transferidos a vacas receptoras sincronizadas o bien sean vitrificados en nitrógeno líquido hasta su uso (Van Wagtenonk-De Leeuw, 2006).

La OPU permite incrementar de forma significativa el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca/año. Podemos realizar hasta dos sesiones de aspiración folicular por semana y donante obteniendo un promedio de 4,1 ovocitos/vaca/sesión. Este número puede au-

mentar a 10,4 ovocitos/vaca/sesión si las donantes son tratadas hormonalmente (Ruiz, 2020).

El número de ovocitos obtenidos por OPU puede estar afectado por factores biológicos y técnicos, entre los que podemos citar la raza, la condición corporal de la vaca donante, la edad, el uso de estimulación hormonal, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en el que se realice la aspiración, el diámetro de la aguja de aspiración, entre otros (Ruiz, 2020).

La OPU puede ser utilizada en vacas adultas en varios estados fisiológicos: no cíclicas, cíclicas, primer tercio de gestación, en las que no responden a estímulos hormonales, animales viejos con desórdenes reproductivos y en terneras y novillas a partir de los 6-8 meses de edad. Con esta técnica se consigue un mayor número de embriones que con la técnica de transferencia de embriones y ovulación múltiple (MOET) (Ruiz, 2020).

La vaca es una especie mono-ovulatoria por lo que la mayoría de los ovocitos obtenidos tras la aspiración folicular terminará degenerando, por ello, antes del proceso de fecundación *in vitro*, debemos clasificar los ovocitos en función de su calidad, ya que no todos tienen la capacidad de ser fecundados y culminar su desarrollo embrionario (Herradón, Quintela, Becerra, Ribal & Fernández, 2007).

Así, los ovocitos obtenidos se clasifican en 5 categorías de mayor a menor calidad (Ruiz, 2020). En la categoría I se incluyen los ovocitos con más de tres capas de células de cúmulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granuloso. Estos ovocitos se consideran los de mejor calidad y por tanto, son muy válidos para las TRA (maduración, fecundación y producción *in vitro* de embriones). En la categoría II, clasificamos a los ovocitos con menos de tres capas de células de cúmulo compactas y con citoplasma generalmente homogéneo uniformemente granuloso. Estos ovocitos se consideran también aptos para maduración, fecundación y producción *in vitro* de embriones. La categoría III engloba ovocitos con una sola capa de células

de cúmulo compactas y con citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras. Estos ovocitos, aunque también se consideran también aptos para TRA, son los de peor calidad de entre los ovocitos válidos. La categoría IV corresponde a ovocitos denudados, sin células del cúmulo y se consideran no viables. Para finalizar, la categoría V consta de los ovocitos madurados *in vivo*, con cúmulo expandido, y se consideran como no viables (Ruiz, 2020).

Los objetivos de este trabajo han sido realizar un seguimiento ecográfico de los ovarios bovinos para comprobar la respuesta folicular de vacas adultas nacidas por diferentes técnicas de reproducción asistida (TRA), tras aplicar un protocolo de estimulación ovárica con FSH (Follitropin®); y determinar la eficacia reproductiva de los animales empleados en el estudio, analizando la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular (OPU) antes y después del protocolo de estimulación empleado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en este trabajo han seguido los requerimientos técnicos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, según el proyecto “Obtención de animales sanos mediante técnicas de reproducción asistida basadas en condiciones fisiológicas”, con nº de registro CEEA 192/2015.

Animales

Para la realización de esta experiencia se han empleado 4 vacas ubicadas en el santuario bovino de la Granja Docente Veterinaria, sin problemas de salud, ni alteraciones reproductivas, con una edad de 4 a 5 años y una condición corporal entre 3,5 y 4 en una escala de 1 a 5. Durante los ensayos, los animales fueron manejados con cuidado evitando cualquier estrés innecesario.

El animal con crotal nº 6762 (vaca 1) se obtuvo por IA con semen congelado de toro de

raza Asturiana de los Valles. El resto de animales nacieron a partir de embriones obtenidos por diferentes TRA utilizando ovocitos de matadero y espermatozoides procedentes de las muestras seminales anteriormente referidas. Las hembras con crotales n° 5276 (vaca 2) y n° 2852 (vaca 3) se obtuvieron mediante TE de embriones conseguidos por TRA con ovocitos cultivados en medio con albúmina sérica bovina (BSA), metodología normalmente empleada en el laboratorio. Y finalmente, la vaca crotal n° 5861 (vaca 4) se obtuvo mediante TE de embriones procedentes de TRA con ovocitos cultivados en medio con fluidos reproductivos naturales (fluidos folicular y oviductal) obtenidos a partir de ovarios y oviductos de matadero con procesado y purificación posterior en laboratorio.

Antes de iniciar la estimulación hormonal de los animales para el inicio de la experiencia, se llevaron a cabo varias sesiones de revisión ecográfica de los ovarios sin estimulación hormonal previa, durante un total de 3 semanas consecutivas. Los datos obtenidos en estas semanas de ensayo se han empleado en el estudio como datos control de animales sin estimular.

Protocolo de estimulación con FSH

El protocolo de estimulación hormonal se llevó a cabo durante 5 semanas en las vacas n°s 2 y 3 y un total de 4 semanas en los animales n°s 1 y 4. Este protocolo de estimulación hormonal conllevó el uso de PGF2 α , GnRH y FSH (Folltropin®).

La experiencia se inició con la administración de PGF2 α (Dalmaprost®, Fatro Ibérica, Barcelona, España), prostaglandina sintética de última generación a base de D-cloprostenol, con actividad luteolítica y uterotónica y sin efectos colaterales, de la que se administraron 2 ml vía i.m. por animal. La aplicación de PGF2 α se realizó de forma programada solo una vez al comienzo de la experiencia para sincronizar el celo en todos los animales.

Dos días después de la administración de PGF2 α , se inyectó a todas las vacas una dosis de 2 ml/vaca, vía i.m. de GnRH (Dalmarelin®, Fatro Ibérica, Barcelona, España). Se trata de un producto sintético (lecirelina, 25 μ g) con gran capacidad de estimulación de receptores hipofisarios y acción prolongada, para provocar e inducir la ovulación en las vacas en estudio.

La estimulación ovárica de los animales se realizó mediante la administración de FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Madrid, España) con un total de 350 UI/animal, distribuidas en 10 ml, vía i.m. y repartidas en 4 inyecciones en dosis decrecientes (3,5, 3, 2 y 1,5 ml, respectivamente), administradas 36 h después de la aplicación de GnRH y durante 3 días consecutivos. Folltropin® contiene un extracto de glándulas pituitarias porcinas con actividad FSH y baja actividad LH, que promueve directamente el crecimiento de los folículos ováricos. En la Tabla 1 se detalla el diseño experimental seguido durante el desarrollo de esta experiencia mediante estimulación hormonal.

Ecografía del ovario

Para la exploración ecográfica se emplearon un ecógrafo portátil IMAGO (ECM-Echo Control Medica, Angoulême, Francia) equipado con sonda lineal endorrectal de doble frecuencia (5-7,5 Mhz), y un ecógrafo FalcoVET (Esao-te Pie Medical, Barcelona, España) dotado de una sonda sectorial microconvex endovaginal de 5-7,5 Mhz (modelo R-10).

Los animales se introducían en la sala de exploración de la nave de vacuno de la GDV, equipada de un potro de contención dotado de las adecuadas medidas de seguridad para restringir los movimientos excesivos del animal e impedir que éstos pudieran interferir y dificultar la interpretación de las imágenes ecográficas.

Antes de realizar los análisis ecográficos se vaciaba el recto de heces para conseguir un buen contacto entre el transductor y la mucosa rectal, para ello, primero se introducía la mano

Tabla 1. Planificación experimental del protocolo de estimulación hormonal.

DIA	MAÑANA (8:00 am)	TARDE (20:00 pm)
VIERNES	PGF2 α Dalmaprost® 2 ml (i.m.)	-
DOMINGO	GnRH Dalmarelin® 2 ml (i.m.)	-
LUNES	-	FSH Folltropin® 3,5 ml (i.m.)
MARTES	FSH Folltropin® 3 ml (i.m.)	FSH Folltropin® 2 ml (i.m.)
MIÉRCOLES	FSH Folltropin® 1,5 ml (i.m.)	-
JUEVES	Ecografía y OPU	-

enguantada y con gel lubricante en forma de cuña y se retiraban las heces para que no interfirieran en la calidad de la imagen ecográfica. Finalizada la limpieza del recto y de la vulva, es recomendable realizar previamente una exploración rectal sin la sonda ecográfica para poder determinar la posición de las diferentes estructuras del aparato reproductor, principalmente útero y ovarios.

El estudio ecográfico de los ovarios se iniciaba siempre en el ovario derecho, desplazando la sonda con diferentes inclinaciones para poder observarlo en toda su extensión y disponer de distintos cortes del mismo y comprobar la presencia de las diferentes estructuras. Se procedía al recuento del número de folículos de cada ovario, así como a la posible presencia de folículos dominantes, con un diámetro mayor de 15 mm y la posibilidad de la existencia de otras estructuras de interés como cuerpos hemorrágicos o CLs. Una vez acabada la revisión ecográfica en el ovario derecho se procedía de igual modo con el ovario izquierdo, y finalmente, se realizaba el recuento total de folículos ováricos en crecimiento por animal y sesión ecográfica.

A continuación, se adjuntan algunas de las imágenes ecográficas obtenidas. A nivel ovárico, podemos encontrar folículos que aparecen

como estructuras más o menos redondeadas y anecoicas (Fig. 1) y, por otro lado, también se pueden observar CLs, como estructuras circulares con cierta ecogenicidad, distinta a la del parénquima ovárico (Fig. 2). Finalmente, en la figura 3 se presenta el detalle de un ovario con estimulación hormonal de FSH (Folltropin®), donde se pueden apreciar varios folículos ováricos en crecimiento en un mismo corte o sección (Fig. 3).

Técnica de OPU

En esta experiencia se llevaron a cabo un total de 8 sesiones de OPU durante 8 semanas, 3 sin estimulación hormonal y 5 con administración de FSH. Para realizar las OPUs se precisa tranquilizar previamente al animal para lo que se empleó xilacina al 2% (Xilagesic®, Laboratorios Calier, Barcelona, España) inyectando 0,8-0,9 ml vía i.m. Además, para provocar analgesia y evitar respuesta inflamatoria se administró carprofeno como AINE (Rimadyl®, Zoetis, Madrid, España) a razón de 12 ml/vaca, vía s.c.; finalmente, se aplicó anestesia vía epidural mediante la inyección de 5-6 ml de lidocaína (Anesvet®, Laboratorios Ovejero, León, España). Una vez tranquilizado el animal, se

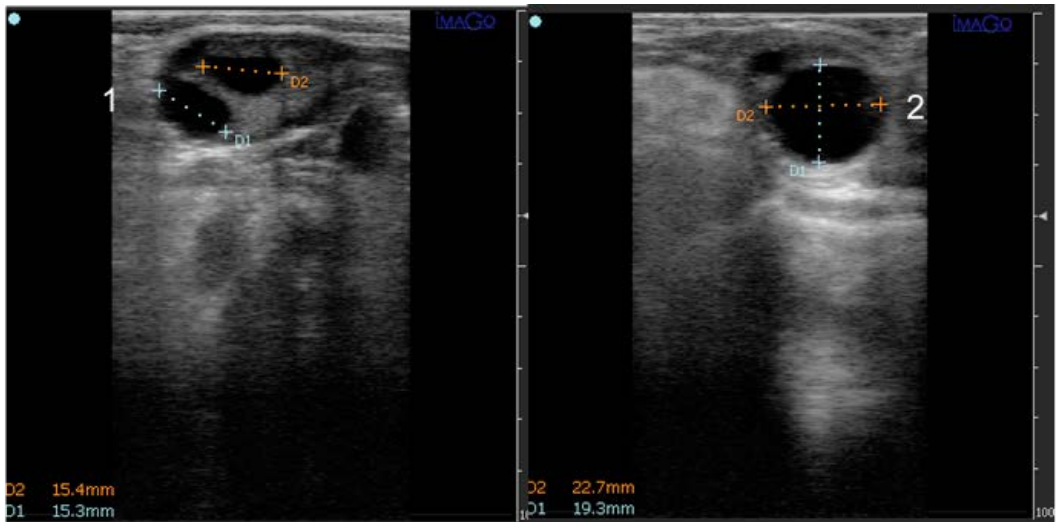


Figura 1. Ecografías de ovarios bovinos. 1. Folículos en crecimiento. 2. Folículo preovulatorio. (Elaboración propia).

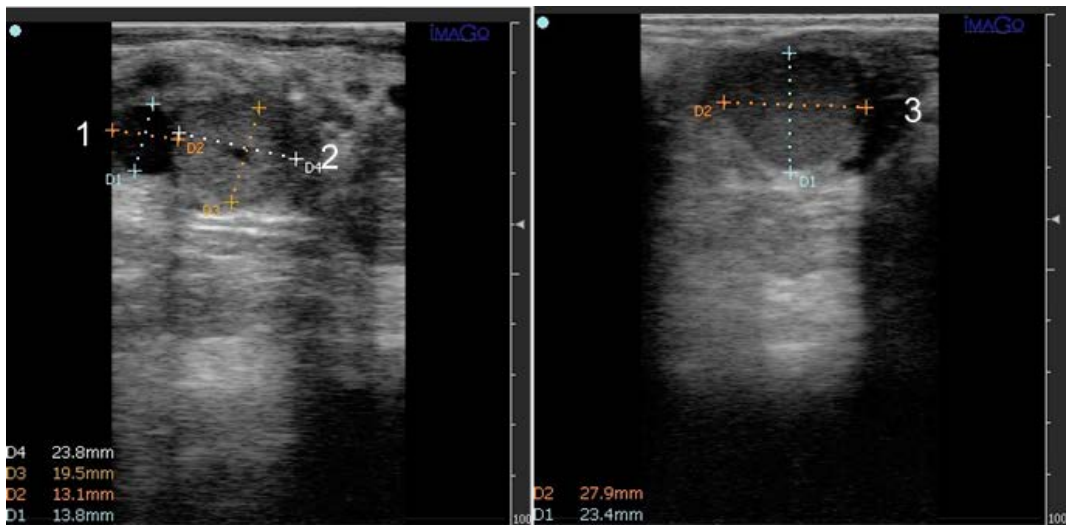


Figura 2. Ecografías de ovarios bovinos. 1. Folículo en crecimiento. 2. Cuerpo lúteo cavitario. 3. Cuerpo lúteo compacto. (Elaboración propia).

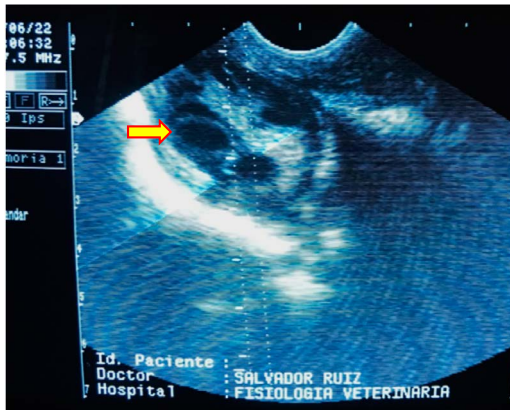


Figura 3. Detalle de ovario bovino estimulado con FSH (Folltropin®). Se aprecia en el mismo plano la presencia de varios folículos en crecimiento (flecha). Podemos observar la línea de biopsia en la pantalla del ecógrafo para facilitar la aspiración folicular (OPU). (*Elaboración propia*).

procedía a vaciar y el recto y limpiar la zona perineal y la vulva con agua tibia y jabón para iniciar la técnica de OPU.

Para la visualización de los folículos se utilizó un ecógrafo FalcoVET dotado de una sonda sectorial microconvex endovaginal de doble frecuencia (5-7,5 Mhz) que se introdujo dentro un mango de OPU de 60 cm de longitud acoplado a la guía de punción (Fig. 4). El mango se lubricó con gel lubricante y se recubrió de un envoltorio plástico sanitario vía endovaginal. Por la guía de punción se introdujo una aguja desechable (18G, 1,2 x 40 mm) conectada a un tubo estéril de recogida de 50 ml mediante una cánula de teflón. Por último, se empleó una bomba de vacío (Aspirator 3, Labotect, Göttingen, Alemania) accionada por pedal para producir la presión negativa de aspiración (70 mm Hg, 20 ml/min) necesaria para recolectar el líquido folicular con los ovocitos (Ruiz, 2020).



Figura 4. Sonda microconvex endovaginal. Mango de OPU y guía de punción, antes (1) y después de su montaje (2). (*Elaboración propia*).

El contenido de los folículos se recogió en tubos estériles de 50 ml en medio PBS (solución salina tamponada con fosfato) adicionada de heparina y suero fetal bovino, para ser transportados en estufa al laboratorio e iniciar la búsqueda de los ovocitos obtenidos por cada vaca. Para contar el número y tipo de ovocito, el fluido recolectado de cada animal se pasó por un filtro de 50 μ de diámetro y los restos de sangre, tejidos y otras células se eliminaron con sucesivos lavados de PBS fresco. Este fluido se depositó en una placa de Petri para observar y evaluar morfológicamente los ovocitos bajo lupa estereoscópica y proceder a determinar su número y evaluar su calidad (Fig. 5).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS v. 22 para Windows.

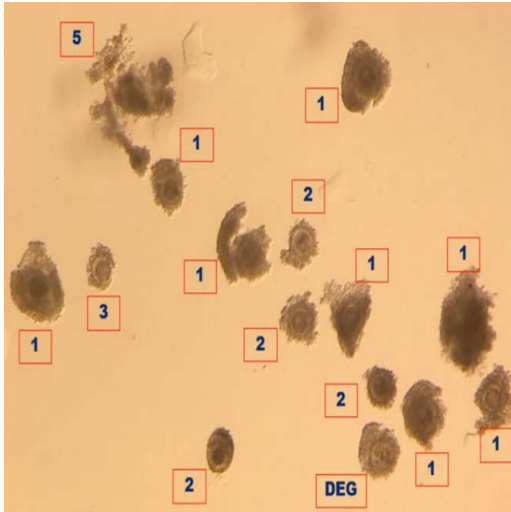


Figura 5. Ovocitos bovinos de diferentes categorías obtenidos por OPU. (*Elaboración propia*).

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el test no paramétrico Shapiro-Wilk (Kolmogorov- Smirnov) y la prueba de Levene, para comprobar que los parámetros no seguían ni una distribución normal ni una homogeneidad de varianzas. Las diferencias estadísticamente significativas se comprobaron mediante el test de Kruskal-Wallis, considerándose estas diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Para la realización de este estudio se llevaron a cabo 3 sesiones OPU sin tratamiento hormonal y 5 sesiones OPU con estimulación ovárica con FSH (Folltropin®). En la última sesión de OPU con estimulación ovárica, no se administró FSH a las vacas 1 y 4 y, por lo tanto, para estos animales se considerará una sesión control más (total 4).

No se encontraron diferencias significativas en el número de folículos aspirados por vaca en las sesiones control ($p = 0,070$); sin embar-

go, tras la estimulación con FSH si existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de folículos aspirados ($p = 0,021$) y en la cantidad de ovocitos obtenidos ($p = 0,005$), siendo superior a los resultados conseguidos en el control (Tabla 2).

En el grupo control, el rendimiento de la OPU fue 33,33% para la vaca 1; 26,92% para la vaca 2; 38,89% para la vaca 3; y 21,43% para la vaca 4. El rendimiento total de la OPU fue en este caso 30,68.

Tras la estimulación con FSH, el rendimiento de la OPU fue 30,95% para la vaca 1; 58,47% para la vaca 2; 49,17% para la vaca 3; y 24% para la vaca 4. El rendimiento total de la OPU fue en este caso de 44,62% (Tabla 2). En general, los rendimientos de la OPU mejoraron tras la estimulación con FSH.

El número de ovocitos obtenidos de la vaca 3 es superior al obtenido por la vaca 4 ($p = 0,010$), de igual manera ocurre con la vaca 2 y la vaca 4 ($p = 0,010$). En el resto de vacas no hay diferencias estadísticamente significativas entre los ovocitos obtenidos.

En la Tabla 3, se detallan los resultados de folículos aspirados y ovocitos obtenidos en cada una de las 4 vacas del estudio según el tratamiento. Observamos que existe una diferencia significativa entre los folículos aspirados en la vaca 2 (118) y la vaca 4 (50) ($p = 0,014$) y entre la vaca 3 (120) y la vaca 4 (50) ($p = 0,014$) tras la estimulación hormonal con FSH, siendo superior el número de folículos aspirados en las vacas 2 y 3 con respecto a la vaca 4. Tras la estimulación con FSH existen diferencias significativas en el número de ovocitos obtenidos entre la vaca 2 (69) y la vaca 1 (26) ($p = 0,014$); la vaca 2 (69) y la vaca 4 (12) ($p = 0,014$); la vaca 3 (59) y la vaca 1 (26) ($p = 0,048$) y la vaca 3 (59) y la vaca 4 (12) ($p = 0,014$), siendo el número de ovocitos mayor en las vacas 2 y 3.

Por otro lado, al comparar los ovocitos obtenidos por sesión de OPU, observamos que tras el tratamiento con FSH, la media de ovocitos obtenidos por sesión aumenta. De la vaca 2, ob-

Tabla 2. Folículos aspirados, ovocitos obtenidos y rendimiento de OPU en las vacas del estudio sin (CT) y con estimulación hormonal (EST) de FSH (Folltropin®).

	VACA 1 (6762)		VACA 2 (5276)		VACA 3 (2852)		VACA 4 (5861)		TOTAL	
	Fol	Ovo	Fol	Ovo	Fol	Ovo	Fol	Ovo	Fol	Ovo
CT1 (n)	5	1	8	1	5	1	2	2	20	5
CT2 (n)	5	1	9	4	5	3	1	0	20	8
CT3 (n)	6	4	9	2	8	3	5	0	28	9
CT4 (n)*	14	4	-	-	-	-	6	1	20	5
TOTAL (n)	30	10	26	7	18	7	14	3	88	27
Rend. OPU CT (%)	33,33		26,92		38,89		21,43		30,68	
EST1 (n)	28	5	25	13	22	9	7	1	82	28
EST2 (n)	22	9	23	15	24	8	15	1	84	33
EST3 (n)	16	4	24	13	25	14	16	6	81	37
EST4 (n)	18	8	24	16	23	16	12	4	77	44
EST5 (n)*	-	-	22	12	26	12	-	-	48	24
TOTAL (n)	84	26	118	69	120	59	50	12	372	166
Rend. OPU EST (%)	30,95		58,47		49,17		24		44,62	

CT: sin FSH. EST: con FSH. Fol: folículos aspirados. Ovo: ovocitos obtenidos. Fol/OPU: folículos aspirados/sesión OPU. Ovo/OPU: ovocitos obtenidos/sesión OPU. Rend. OPU: rendimiento OPU. *: vacas 1 y 4 sin FSH en semana 5 (CT4).

Tabla 3. Folículos aspirados y ovocitos obtenidos en las vacas del estudio según tratamiento.

	VACA 1 (6762)		VACA 2 (5276)		VACA 3 (2852)		VACA 4 (5861)	
	CT	EST	CT	EST	CT	EST	CT	EST
OPU (n)	4	4	3	5	3	5	4	4
Fol (n)	30	84	26	118	18	120	14	50
Fol/OPU (media ± ESM)	7,5 ± 2,2	21 ± 2,6	8,7 ± 0,3	23,6 ± 0,5	6,0 ± 1,0	24,0 ± 0,7	3,5 ± 1,2	13,0 ± 2,0
Ovo (n)	10	26	7	69	7	59	3	12
Ovo/OPU (media ± ESM)	2,5 ± 0,9	6,5 ± 1,2	2,3 ± 0,9	13,8 ± 0,7	2,3 ± 0,7	11,8 ± 1,5	0,8 ± 0,5	3,0 ± 1,2

ESM: error estándar media. CT: sin FSH. EST: con FSH. Fol: folículos aspirados. Ovo: ovocitos obtenidos. Fol/OPU: folículos aspirados/sesión OPU. Ovo/OPU: ovocitos obtenidos/sesión OPU.

Tabla 4. Clasificación de la calidad ovocitaria durante las sesiones de OPU sin estimulación hormonal.

VACA	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Degenerados	Total
1 (6762)	1	1	1	1	3	3	10
2 (5276)	0	0	1	0	0	6	7
3 (2852)	0	2	0	1	0	4	7
4 (5861)	1	0	0	0	1	2	3
Total	2	3	2	2	4	14	27
Porcentaje (%)	7,41	11,11	7,41	7,41	14,81	51,85	

Tabla 5. Clasificación de la calidad ovocitaria durante las sesiones de OPU con estimulación con FSH.

VACA	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Degenerados	Total
1 (6762)	6	3	4	3	3	7	26
2 (5276)	18	6	15	16	1	13	69
3 (2852)	19	9	7	13	1	10	59
4 (5861)	3	1	3	0	0	5	12
Total	46	19	29	32	5	35	166
Porcentaje (%)	27,71	11,45	17,47	19,28	3,01	21,08	

tuvimos el mayor número de ovocitos por sesión de OPU tras la estimulación hormonal ($13,8 \pm 0,7$), seguida de la vaca 3 ($11,8 \pm 1,5$), vaca 1 ($6,5 \pm 1,2$) y vaca 4 ($3,0 \pm 1,2$). En las sesiones sin hormonas, la mejor vaca fue la vaca 1 ($2,5 \pm 0,9$), seguida por la vaca 2 ($2,3 \pm 0,9$) y la vaca 3 ($2,3 \pm 0,7$) y, por último, la vaca 4 ($0,8 \pm 0,5$) (Tabla 3).

Con respecto a la calidad ovocitaria en las OPU realizadas sin FSH (Tabla 4), podemos observar que la vaca 1 fue de la que obtuvimos una mayor cantidad de ovocitos (10), aunque solo 3 de tipos I-III. Si consideramos el total de animales, observamos que la mayoría de los ovocitos obtenidos fueron degenerados (51,85%), seguido de ovocitos categoría V (14,81%), categoría II (11,11%) y categorías I, III y IV (7,41%).

En la Tabla 5, se detalla la calidad ovocitaria obtenida durante las sesiones de OPU mediante estimulación hormonal con FSH (Folltropin®). Observamos que la vaca 2 es el animal del que más ovocitos se consiguieron (69), de un total de 166. En este caso, obtuvimos más ovocitos tipo I (27,71%), seguido de ovocitos degenerados (21,08%), categoría IV (19,28%), categoría III (17,47%), categoría II (11,45%) y finalmente, categoría V (3,01%).

DISCUSIÓN

El aumento en el número de folículos tras la estimulación con FSH está respaldado por la bibliografía, ya que está demostrado que la estimulación ovárica con FSH incrementa el número

ro de folículos que se encuentran en el ovario (Goodhand, Staines, Hutchinson & Broadbent, 2000; Chacón, Martínez, Valbuena, Peña & Bernal, 2004).

En el grupo control, el rendimiento total de la OPU fue menor que la del estudio realizado por Sendag, Cetin, Alan, Helder & Niemann (2008), en el que se puncionaron 247 folículos, recolectándose 191 ovocitos con una tasa de recuperación del 77%. En el estudio realizado por Alvarado, Gamarra, Gállegos & Samillán (2016) se realizaron un total de 716 aspiraciones foliculares con un promedio de 179 aspiraciones por vaca y la obtención de 403 ovocitos (56,3%), resultado superior al obtenido en nuestro estudio.

En general, los rendimientos de la OPU mejoraron tras la estimulación con FSH, siendo nuestro porcentaje de recuperación menor al obtenido por Samaniego (2017) con 80,4% en OPU 40h y 80,3% en OPU 48h utilizando un protocolo de estimulación ovárica a base de FSH-LH (Pluset®) en vaquillas de genotipo Criollo.

Nuestro porcentaje de recuperación de las OPUs sin FSH es menor que el obtenido en las OPUs con FSH, lo mismo ocurre en el estudio realizado por Samaniego (2017), en el que al comparar el número de folículos visualizados y ovocitos recuperados de los tratamientos con estimulación ovárica (OPU 40h y OPU 48h) frente a los que no recibieron estimulación (testigos 40h y 48h), se determinó la existencia de diferencia estadística ($p < 0,05$).

Por otro lado, al comparar los ovocitos obtenidos por sesión de OPU, observamos que tras el tratamiento con FSH, la media de ovocitos obtenidos por sesión aumenta. De Roover, Feugang, Bols, Genicot & Hanzen (2008) obtuvieron una media de $11,8 \pm 8,2$ ovocitos/por sesión con FSH, resultados similares a los obtenidos para las vacas 2 y 3 y mayores que los obtenidos en las vacas 1 y 4. En las sesiones sin hormonar, nuestros resultados son menores a los obtenidos por Hidalgo, Fernández, Duque, Facal, Díaz, Prendes, Menéndez, Gómez, Prieto

& Díez (2002), quienes recogieron una media de 6,8 ovocitos/vaca/sesión OPU.

En el estudio realizado por Aller, Mucci, Kaiser, Ríos, Callejas & Alberio (2010) sin FSH, se recolectaron un total de 60 ovocitos a partir de 10 vacas en 4 sesiones de OPU (total 40 sesiones), número superior a los 27 ovocitos obtenidos por nosotros en 14 sesiones OPU; 18 (30%) eran de tipo I y II, en nuestro caso, 2 (7,41%) eran de categoría I y solo 3 (11,11%) categoría II. Aller et al. (2010) obtuvieron 27 ovocitos (45%) de categoría III, resultado muy superior al de nuestro estudio y 15 (25%) categoría IV en comparación con los 2 ovocitos (7,41%) obtenidos por nosotros para ambas categorías.

En el estudio realizado por Aller et al. (2010), el tratamiento con FSH mejoró la calidad de los ovocitos recuperados y significativamente más ovocitos fueron categorizados como viables (tipos I y II). En este estudio se recogieron un total de 119 ovocitos de 10 vacas en 4 sesiones de OPU (40 sesiones), con 0 a 8 ovocitos recolectados/OPU. De los 119 ovocitos que se obtuvieron, se encontraron 47 (39,5%) de categoría I y II, 47 (39,5%) de categoría III y 25 (21%) de categoría IV, lo que supone unos resultados similares a los nuestros, aunque ellos obtuvieron un número mayor de ovocitos tipo III. En nuestro estudio se obtuvieron 166 ovocitos, cifra superior, usando menos animales (4) y con un similar, aunque menor, número de sesiones de OPU (32).

Al utilizar el protocolo con FSH (Foltropin®, 350 UI/vaca) aumentó la calidad de los ovocitos, al tener un mayor porcentaje de ovocitos de categoría I con respecto a lo observado en la Tabla 4. Similares resultados reportan Sendag et al. (2008), quienes encontraron que la estimulación ovárica con FSH afectó positivamente a la calidad de los ovocitos obtenidos por OPU. De igual forma, en los trabajos de Chacón et al. (2004), los animales tratados con FSH produjeron significativamente más ovocitos de buena calidad y el número de ovocitos tipo I fue estadísticamente mayor en los animales estimulados hormonalmente y aspirados una vez a la

semana. En el estudio realizado por Goodhand et al. (2000), el tratamiento con FSH mejoró la calidad de los ovocitos recuperados, obteniéndose más ovocitos de categoría I y no hubo efecto significativo de la FSH en el número de ovocitos de categoría II, III o IV.

A lo largo de las semanas de estimulación, al realizar el seguimiento ecográfico encontramos CLs en los ovarios, que eran eliminados mediante la administración de PGF2 α (Daltaprost[®]) lo que provocaba su luteólisis. La PGF2 α provoca que la secreción de P4 se reduzca hasta niveles basales, desapareciendo así la retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis haciendo que la hembra inicie otro ciclo estral (Aréchiga, Cortéz, Hernández, Flores & Ruiz, 2019).

CONCLUSIONES

El número de folículos aspirados y la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos durante las sesiones de estimulación hormonal con FSH (Folltropin[®]) con una concentración de 350 UI/animal, es superior al número de folículos aspirados y a la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos en los ensayos sin estimulación hormonal.

La tasa de recuperación de ovocitos ha sido mayor en las vacas sometidas al protocolo de estimulación con FSH (Folltropin[®]), en comparación con las sesiones control sin dicha estimulación.

Desde el punto de vista de la eficacia reproductiva, de entre los animales estudiados, la respuesta de las vacas 2 (5276) y 3 (2852) se puede considerar buena, dado los resultados obtenidos de cantidad y calidad ovocitaria en respuesta al tratamiento hormonal con FSH (Folltropin[®]) y al rendimiento en OPU.

La respuesta de la vaca 4 (5861), desde el punto de vista de la eficacia reproductiva, de entre los animales estudiados, se considera mala, dado los resultados obtenidos en cuanto a cantidad y calidad ovocitaria en la respuesta

al tratamiento hormonal con FSH y al rendimiento en OPU.

AGRADECIMIENTOS

Esta publicación es parte del proyecto de I+D+i PID2020-113366RB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por “FEDER Una manera de hacer Europa”.

REFERENCIAS

- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Aller, J.F., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., Ríos, G., Callejas, S.S., & Alberio, R.H. (2010). Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 119(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.11.009>
- Alvarado, A.E., Gamarra, G., Gállegos, A., & Samillán, V. (2016). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Anales Científicos*, 77(1), 63–68. <https://doi.org/10.21704/ac.v77i1.545>
- Aréchiga, C., Cortés, Z., Hernández, P., Flores, G., Rochín, F., & Ruiz, E. (2019). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico Veterinario*, 9(1), 1–21. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Ball, P.J.H., & Peters, A.R. (2004). *Reproduction in Cattle*. Blackwell, Oxford. U.K.
- Billón, M., Sena, J., Aguilar, H., & Ruiz, S. (2018). Protocolo de estimulación ovárica para incrementar la calidad de los ovocitos bovinos obtenidos por OPU. *An. Vet. Murcia*, 34, 69–86.
- Bó, G.A., Guerrero, D.C., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., & Mapletoft,

- R.J. (2010). New approaches to superovulation in the cow. *Reprod. Ferti. Dev.*, 22(1), 106–112. <https://doi.org/10.1071/RD09226>
- Chacón, L., Martínez, W., Valbuena, D., Peña, M.A., & Bernal, S.M. (2004). Efecto de la estimulación hormonal en vacas Girholando sobre el número de folículos, recolección de oocitos y producción de embriones in vitro. *Actualidad & Divulgación Científica*, 7(2), 43–52. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/2581?show=full>
- De Roover, R., Feugang, J.M., Bols, P.E., Genicot, G., & Hanzen, C.H. (2008). Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reprod. Dom. Anim.*, 43(2), 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
- DesCôteaux, L., Gnemmi, G., & Colloton J. (2009). Ultrasonography of the Bovine Female Genital Tract. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.*, 25(3), 733–752. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.009>
- Díaz, N., Garrido, R.P., & Castellano, J. (2007). Methodology and Techniques. Ultrasonography: Scientific bases, ultrasonographs and ultrasonographic language. *Semergen*, 33(7), 362–369. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73916-3](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73916-3)
- Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F., & Crowe, M.A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 124(3-4), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- Fortune, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, 50(2), 225–232. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>
- Ginther, O.J., Knopf, L., & Kastelic, J.P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, 87(1), 223–230. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870223>
- Giraldo, J.J., Ordoñez, S., Gómez, J., & Restrepo, G. (2017). Evaluation of ovarian stimulation and quality of bovine oocytes obtained by follicular aspiration. *J. Agric. Anim. Sci.*, 6(1), 20–28. <https://doi.org/10.22507/jals.v6n1a2>
- Goodhand, K.L., Staines, M.E., Hutchinson, J.S., & Broadbent, P.J. (2000). In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, 63(3-4), 145–158. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00186-X)
- Hansen, P.J. (2020). Implications of Assisted Reproductive Technologies for Pregnancy Outcomes in Mammals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 8, 395–413. doi: 10.1146/annurev-animal-021419-084010.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). Cuzco (Perú). 1022–1301. <https://www.researchgate.net/publication/265560850>
- Hidalgo, C.O., Fernández, I., Duque, P., Facal, N., Díaz, E., Prendes, J.M., Menéndez, J., Gómez, E., Prieto, L., & Díez, C. (2002). Primeros terneros producidos in vitro tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Arch. Zootec.*, 51(196), 411–422.
- Kakar, S.S., Rahe, C.H., & Neill, J.D. (1993). Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10(4), 335–342. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(93\)90037-C](https://doi.org/10.1016/0739-7240(93)90037-C)
- Lenis, Y.Y., Tamayo, L.J., Rodríguez, N., Duque, L., Naranjo, J.I., Carrillo, D.F., & Tarazona, A.M. (2014). Reproducción de la vaca: manual didáctico sobre la reproducción, la gestación, la lactancia y el bienestar de la hembra bovina. Corporación Universitaria Remington.

- Mapletoft, R.J., & Bó, G.A. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 24(1), 278–283. <https://doi.org/10.1071/RD11919>
- Mapletoft, R.J., & Bó, G.A. (2013). Innovative strategies for superovulation in cattle. *Anim. Reprod.*, 10(3), 174–179. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6048f7783717068b468f/pdf/anim-reprod-10-3-174.pdf>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAPA). Información del sector de vacuno de carne. Recuperado 30/06/2022. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/vacuno-de-carne/informacion-del-sector/>
- Nebel, R., & DeJarnette, M. (2011). Anatomía y fisiología de la reproducción bovina. *Select Series*. 1–6. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/97-fisiologia.pdf
- Roche, J.F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis: a symposium in perspective. *Rev. Reprod.*, 1(1), 19–27. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0010019>
- Ruiz, S. (2020). Ovum Pick-Up (OPU) in Cattle: An Update. In: *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction. Current Trends and Practical Applications for Reproductive Management*. Gardón, J.C., & Satué, K. (Eds.). Apple Academic Press. Pp.139–183.
- Samaniego, J.X. (2017). Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas. *Fac. Ciencias Agropecuarias. Univ. Cuenca. Ecuador*. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Haderler, K.G., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 106(1-2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.007>
- Senger, P.L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition* (2nd ed.). Current Conceptions.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A.M. (2006). Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65(5), 914–925. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007>
- Weck, J., Fallest, P.C., Pitt, L.K., & Shupnik, M.A. (1998). Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Mol. Endocrinol.*, 12(3), 451–457. <https://doi.org/10.1210/mend.12.3.0070>