

SUPERESTIMULACIÓN OVÁRICA, OPU Y CALIDAD OVOCITARIA EN VACAS DE RAZA MURCIANO-LEVANTINA

Ovarian superstimulation, OPU and ovocyte quality in Murciano-Levantina breed cows

García-González, E.; Heras, S.; Ramal, I.; Ruiz, S.

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. España.

Autor de correspondencia: sruiz@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Recibido: 08/10/2025

Aceptado: 10/10/2025

RESUMEN

El objetivo del estudio ha sido la evaluación del rendimiento de la estimulación ovárica mediante la aplicación de una dosis única de hormona folículo estimulante recombinante bovina (FSHrb) y la determinación de la calidad de los ovocitos obtenidos mediante OPU (*Ovum Pick-Up*), en vacas de raza Murciano-Levantina (M-L), para contribuir a la recuperación de la raza.

Se seleccionaron dos vacas donantes M-L, llamadas *Madroña* y *Unicornio*, que fueron sometidas a un protocolo de superestimulación ovárica con una dosis única de FSHrb durante 4 sesiones OPU/animal. Los ovocitos recuperados fueron cuantificados y clasificados según su calidad, en grados I a IV y degenerados. Solo los ovocitos viables (grados I-III) fueron madurados *in vitro* y vitrificados.

Se obtuvieron un total de 104 ovocitos, 45 de *Madroña* (43,27%) y 59 de *Unicornio* (56,73%); de los que 56 fueron viables (53,85%). Se observó la presencia de ovocitos madurados *in vivo* en la 2ª y 3ª sesión en ambas hembras replanteándose una última sesión de OPU sin estimulación, obteniendo resultados similares a las sesiones previas. Finalmente, se vitrificaron 65 ovocitos (62,50%) del total de ambas vacas.

Al disponer de los resultados de calidad ovocitaria en estos mismos animales tras la estimulación hormonal con 4 dosis de FSH porcina (FSHp, Pluset®) (Metony et al., 2025), se ha realizado un estudio estadístico comparativo con nuestros resultados.

El estudio concluye que la utilización de una única dosis de FSHrb es una alternativa viable para la recuperación de ovocitos de vacas de raza M-L. La respuesta ovárica obtenida fue comparable, en cuanto a la calidad y cantidad de ovocitos viables, a la observada en estudios previos con FSHp. Este enfoque representa un avance significativo no solo en términos de eficiencia reproductiva, sino también en la mejora de bienestar animal, al reducir el número de manipulaciones y el estrés asociado.

Palabras clave: superestimulación ovárica, FSHrb, OPU, calidad ovocitaria, bovino, raza Murciano-Levantina.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the performance of ovarian stimulation using a single dose of recombinant bovine follicle-stimulating hormone (rbFSH) and to determine the quality of the oocytes obtained through OPU (Ovum Pick-Up) in Murciano-Levantina (M-L) cows, with a view to contributing to the recovery of the breed.

Two M-L donor cows, named *Madroña* and *Unicornio*, were subjected to an ovarian superstimulation protocol with a single dose of rbFSH during four OPU sessions per animal. The recovered oocytes were quantitatively analysed and classified according to their quality, into grades I to IV and degenerated. Only viable oocytes classified as grades I-III were matured *in vitro* and vitrified.

A total of 104 oocytes were obtained, 45 from *Madroña* (43.27%) and 59 from *Unicornio* (56.73%), of which 56 were found to be viable (53.85%). The presence of oocytes that had been matured *in vivo* was observed in the 2nd and 3rd sessions in both females. This observation prompted a final OPU session that was not stimulated, which yielded results that were like the results of the previous sessions. Finally, 65 oocytes (62.50%) from both cows were vitrified.

As the oocyte quality results for these same animals after hormonal stimulation with four doses of porcine FSH (pFSH, Pluset®) were available (Metony et al., 2025), a comparative statistical study was carried out with our results.

The study concludes that the use of a single dose of rbFSH is a viable alternative for oocyte recovery in M-L breed cows. The ovarian response obtained was comparable, in terms of the quality and quantity of viable oocytes, to that observed in previous studies with pFSH. This approach signifies a substantial advancement, not only in terms of reproductive efficiency, but also in enhancing animal welfare by minimising the number of manipulations and the associated stress.

Keywords: ovarian superstimulation, rbFSH, OPU, oocyte quality, bovine, Murciano-Levantina breed.

INTRODUCCIÓN

España cuenta con un censo bovino de 6.173.955 animales, con una concentración destacada en comunidades de Castilla y León, Galicia, Extremadura y Cataluña, líderes en producción tanto de leche como de carne. En la Región de Murcia, se dispone de un censo de 97.395 cabezas de ganado bovino repartidas en 371 explotaciones (MAPA, 2024). Sin embargo, el número de explotaciones productoras a nivel nacional ha disminuido un 4% respecto al año anterior, debido principalmente a los problemas de rentabilidad de las explotaciones más pequeñas (MAPA, 2025).

En España existen en torno a 41 razas bovinas autóctonas. Entre ellas, se encuentra la raza Murciana-Levantina (M-L), conocida por su doble aptitud trabajo-carne y una morfología particular, como la disposición lateral en rueda de los cuernos y el dimorfismo en la coloración del pelaje (MAPA, 2025). La raza M-L entró en declive a mediados del s. XX con la mecanización agrícola, reduciéndose su censo a solo 125 ejemplares en 1980 (Almela et al., 2011) y a 39 animales en la actualidad, localizados entre Murcia, Comunidad Valenciana y Andalucía (MAPA, 2025). Hoy en día, estos animales sólo se usan en certámenes ganaderos y festejos populares, y su conservación es promovida por asociaciones

locales de ganaderos, como es la Asociación de Criadores de la Raza Murciano-Levantina (AVAMUR) de Murcia (Almela et al., 2025).

Uno de los mayores desafíos para la conservación de esta raza autóctona es el elevado grado de consanguinidad entre los ejemplares, lo que hace insuficientes las técnicas reproductivas tradicionales. Por ello, cobra especial importancia el uso de técnicas más avanzadas y específicas de conservación *ex situ*. Éstas incluyen la criopreservación de gametos y la producción *in vitro* de embriones (PIV), herramientas clave para asegurar la continuidad de las razas en peligro de extinción (Metony et al., 2025). Este tipo de acciones se enmarcan en el plan estatal de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas, establecido por el Real Decreto 2129/2008, que busca proteger el patrimonio genético ganadero del país y dar una segunda oportunidad a razas en peligro de extinción como es la M-L (Almela et al., 2025).

Con el objetivo de ampliar la variabilidad genética y reforzar las reservas del Banco de Germoplasma del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), se utilizan técnicas como es la punción folicular transvaginal ecoguiada (*Ovum Pick-Up*, OPU), que permite recuperar ovocitos de hembras vivas. Estos ovocitos pueden ser criopreservados o utilizados en procedimientos de reproducción asistida como son la maduración *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* de embriones. Los embriones así obtenidos pueden ser transferidos posteriormente a novillas receptoras de razas bovinas no amenazadas (Ruiz & Poto, 2017; Metony et al., 2025).

La OPU consigue un mayor rendimiento si las hembras son previamente tratadas hormonalmente para estimular su desarrollo folicular. Tradicionalmente, se ha empleado hormona folículo estimulante (FSH) de origen porcino (FSHp) presente en preparados comerciales como son Folltropin® (Vetoquinol) y Pluset® (Calier), disponibles en concentraciones de 700 y 1000 UI, respectivamente (Santos et al., 2017). Sin embar-

go, la corta vida media de estos fármacos exige varias administraciones durante 3–4 días, lo que incrementa el manejo de los animales, el estrés asociado y la carga operativa (Martemucci & D'Alessandro, 2013). Además, al tratarse de un preparado hormonal de origen porcino, se va a producir cierta inmunización, con la producción de anticuerpos anti-FSHp en las vacas después de varias administraciones, con la consiguiente reducción en la respuesta folicular a lo largo del tiempo (Fry, 2020; Metony et al., 2025). Por todo ello, el empleo de una FSH homóloga de origen recombinante (FSHrb), se presenta como una alternativa más eficiente y fisiológica, al requerir menos administraciones y ofrecer una mejor sincronización del desarrollo folicular. Su mayor compatibilidad con la FSH endógena podría mejorar la calidad ovocitaria, al favorecer una respuesta más homogénea y adecuada para la maduración de ovocitos competentes.

El principal objetivo de los protocolos de superestimulación ovárica en el ganado bovino es estimular el desarrollo de folículos antrales y promover la ovulación de ovocitos competentes para con ello, aumentar la producción de embriones viables. No obstante, la variabilidad intrínseca entre las hembras donantes influye significativamente en los resultados. Actualmente, los protocolos permiten una aplicación más sencilla en el campo, facilitando la sincronización entre animales y optimizando la respuesta superovulatoria en grupos de vacas donantes (Bó & Mapletoft, 2020).

El uso de la estimulación hormonal antes de realizar una técnica de reproducción asistida es una práctica en crecimiento por sus múltiples beneficios. En el caso de vacas *Bos indicus* se ha visto un aumento en el número total de folículos posiblemente, debido a la tendencia natural de esta especie a presentar una mayor población folicular basal. Aplicando estos protocolos a las vacas de la especie *Bos taurus*, el empleo de la estimulación hormonal ha demostrado mejorar la calidad del complejo cúmulo-ovocito (CCO) (Fry, 2020).

El protocolo de estimulación con gonadotropinas varía en función de si las donantes pertenecen a la especie *B. indicus* o a *B. taurus*, si se trata de razas lecheras o de carne, y si son animales adultos o jóvenes. Además, esta elección se ve influida por la frecuencia deseada de las sesiones de OPU (Fry, 2020). En conjunto, los datos disponibles sostienen que el tipo de FSH, la dosis, la frecuencia y la duración del tratamiento influyen en la formación folicular, la respuesta ovárica y la eficiencia en la producción de embriones en el contexto de la reproducción bovina (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022).

En los últimos años, se han evaluado diversos protocolos de estimulación ovárica con FSH, generalmente de origen porcino (FSHp), para la obtención de ovocitos mediante OPU en bovinos. Tanto la administración única como múltiple de FSHp aumentó el número de folículos aspirados y ovocitos recuperados frente a animales sin tratamiento (Ongaratto et al., 2020; Morera-Jiménez et al., 2022). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de blastocistos obtenidos entre grupos tratados y controles (Ongaratto et al., 2020). Comparaciones entre una inyección única de FSH mezclada con hialuronato y múltiples inyecciones de FSH en solución salina mostraron resultados similares en la estimulación folicular y recuperación de ovocitos en vacas de carne y en novillas Holstein (Ongaratto et al., 2020; Demetrio et al., 2021). En vacas de raza Pardo Suiza en zonas de elevada altitud, protocolos convencionales y dosis única de gonadotropina coriónica equina (eCG), que presenta actividad análoga a FSH y LH, tuvieron respuestas ováricas y tasas embrionarias comparables (Allcca et al., 2023). Estos hallazgos sugieren que los protocolos simplificados con una sola inyección de FSH son eficaces y reducen el estrés animal.

La OPU es una técnica mínimamente invasiva desarrollada para la recuperación de ovocitos a partir de folículos antrales en animales vivos (Dellenbach et al., 1984). En bovinos, los ovocitos pueden obtenerse a través de OPU con o

sin estimulación hormonal previa. Esta metodología permite la recolección de ovocitos inmaduros directamente desde los folículos ováricos de 6 a 10 mm de diámetro (Wrenzycki, 2018). Una de las principales ventajas de la OPU sin estimulación hormonal radica en que no interfiere con el ciclo estral normal de los animales, lo que permite su aplicación en un amplio rango de donantes. Esto incluye desde terneras de 6 meses de edad a vacas con hasta 3 meses de gestación. Esta versatilidad convierte a la OPU en una alternativa superior a la transferencia de embriones por ovulación múltiple (MOET), consolidando su creciente implementación en programas reproductivos bovinos (Ruiz, 2020).

La combinación estratégica de las técnicas de OPU/PIV ha revolucionado los programas de mejora genética en bovinos. Esta sinergia tecnológica permite generar cerca de cincuenta terneros por vaca donante al año, una cifra inalcanzable con métodos reproductivos convencionales como el MOET. Consecuentemente, OPU y PIV se consolidan como herramientas indispensables para obtener descendencia adicional de donantes de alto valor genético que, por diversas razones, no son aptas para programas de superovulación tradicionales (Fry, 2020; Motta et al., 2025). Además de su aporte en la producción de embriones, la OPU es una fuente valiosa para biotecnologías reproductivas como son la clonación y la transgénesis (Ruiz, 2014).

No obstante, los resultados dependen de diversos factores técnicos y biológicos, los cuales han sido objeto de estudio y perfeccionamiento para su optimización (Ruiz, 2020). En cuanto a los factores técnicos, uno de los avances más significativos ha sido el perfeccionamiento de la aguja de punción, donde la implementación de un diseño estéril y desechable y la optimización de la geometría ha supuesto una mejora sustancial en la facilidad y seguridad del procedimiento y contribuido a disminuir la proporción de ovocitos denudados recolectados (Ruiz, 2014). Por otro lado, estos resultados también dependen en gran medida de factores tanto biológicos como

logísticos, entre los que podemos citar el animal donante, si se aplicó o no una pre-estimulación hormonal, la frecuencia de las sesiones de OPU o la experiencia del operador (Ruiz, 2020).

El éxito de los programas de PIV en bovinos depende en gran medida de la cantidad y calidad de los CCOs que se obtienen de las vacas donantes. La calidad ovocitaria se mide por su capacidad para llegar a desarrollarse en un embrión/blastocisto viable (Fry, 2020; Motta et al., 2025). Durante el desarrollo folicular, el folículo y el ovocito aumentan considerablemente de tamaño, lo que impacta en la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados (Scaramuzzi et al., 2011). La competencia de desarrollo ovocitario se adquiere cuando los folículos alcanzan 2–3 mm de diámetro (Hytel et al., 1997). Sin embargo, en vacas no estimuladas, la eficiencia de recuperación de los CCOs disminuye a medida que aumenta el tamaño folicular (Seneda et al., 2001).

El momento en el que se practica la OPU en relación con la dinámica de la onda folicular es crucial. La realización de la OPU durante la fase de crecimiento común folicular ha demostrado resultar en un mayor número de folículos de más de 5 mm de diámetro y de CCOs recuperados, en comparación con la OPU realizada durante la fase de regresión del folículo dominante (Machatkova et al., 2000). Dentro de la fase de crecimiento folicular común, no se han encontrado diferencias significativas entre los días de su duración. Esto resalta la necesidad de sincronizar las ondas foliculares emergentes para optimizar el procedimiento en vacas no estimuladas (Cavaliere et al., 2018; Motta et al., 2025).

Los ovocitos de folículos dominantes muestran mayor capacidad de desarrollo embrionario (Nivet et al., 2012), lo que sugiere que la dominancia folicular está relacionada con una mayor competencia del desarrollo (Motta et al., 2025). Al alcanzar la dominancia, el folículo cambia su dependencia hormonal de FSH a LH para completar su maduración. Basado en este conocimiento, se ha implementado el “*coasting*”, que

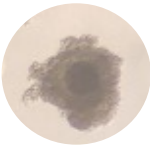
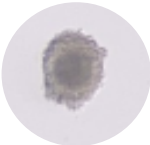
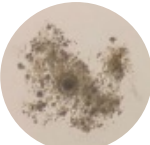
consiste en suspender la administración de FSH entre 40 y 70 h antes de la OPU. Este período simula la transición hormonal natural, optimizando la calidad de los ovocitos. El *coasting* se ha convertido en una práctica común en protocolos de estimulación ovárica con FSH previo a la OPU/PIV (Sirard et al., 1999; Blondin et al., 2002; Nivet et al., 2012; Motta et al., 2025).

Atendiendo al número de capas de células del cúmulo, la apariencia del citoplasma y el grado de compactación del cúmulo, los CCOs se pueden clasificar en grados I a IV y degenerados (Demetrio & Barfield, 2021) (Tabla 1). Los CCOs clasificados como grados I, II y III se consideran viables para su uso en PIV. En cambio, los de grado IV y degenerados se consideran no viables.

La hipótesis del presente trabajo plantea que la administración de una única dosis de FSHrb producirá una mayor respuesta en la estimulación ovárica y en la calidad ovocitaria de los ovocitos obtenidos por OPU, así como también reducirá el estrés de los animales sometidos a tratamiento al emplear una sola dosis, en relación con otros tratamientos superovulatorios con FSHp que suelen precisar de varias administraciones seriadas durante 3–4 días.

Como objetivo se ha propuesto la evaluación del rendimiento de la estimulación ovárica por la aplicación de una dosis única de FSHrb y la determinación de la calidad de los ovocitos obtenidos mediante OPU en vacas de raza M-L. Finalmente, los ovocitos viables así conseguidos, una vez madurados *in vitro* y vitrificados, servirán para incrementar el Banco de Germoplasma de esta raza autóctona en peligro de extinción. Además, al disponer de los resultados de calidad ovocitaria obtenidos en estos mismos animales, en una experiencia anterior realizada en 2024, tras la estimulación hormonal con 500 UI de FSHp (Pluset®) en 4 administraciones seriadas durante 3 días (Metony et al., 2025); se ha diseñado un estudio estadístico comparativo con los resultados actuales de calidad ovocitaria obtenidos mediante la estimulación ovárica con una única dosis de 800 UI de FSHrb, en los mismos animales, un año después.

Tabla 1. Clasificación de los CCOs (Demetrio & Barfield, 2021). (Fuente imágenes: elaboración propia).

Grado	Características	Imagen
I	• Más de 3 capas de células del cúmulo compactas. • Interior oscuro y homogéneo.	
II	• 1–2 capas de células del cúmulo. • Interior generalmente homogéneo. • De Grado I pero con citoplasma granulado.	
III	• Menos de 1 capa de células del cúmulo • Citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras. • De Grado II con citoplasma granulado.	
IV	• Células del cúmulo expandidas, a veces con apariencia aglutinada. • De Grado III con el citoplasma granulado.	
DEG	• Citoplasma retraído, muy granulado y/o claro, zona pelúcida discontinua.	

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo han seguido los requerimientos técnicos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (UMU, CEEA 827/2023) y la Dirección General de Ganadería, Pesca y Acuicultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (código identificación N° A13230505).

1. Animales

Para la realización del presente estudio se ha contado con dos vacas de raza M-L identificadas como *Madroña* y *Unicornio*. Ambas pertenecen a la Asociación de Criadores de la vaca M-L (AVAMUR) y se encuentran alojadas en las instalaciones de la nave bovina de la Granja Docente Veterinaria (GDV) de la UMU.

2. Protocolo de estimulación hormonal (FSHrb)

La FSHrb empleada en el presente estudio ha sido suministrada por una empresa de biotecnología y se encuentra actualmente en fase de desarrollo de patente, por lo que su composición y método de obtención son confidenciales. La FSHrb se recibió en viales Eppendorf de 1.5 ml conteniendo un volumen de 1 ml de hormona con 800 UI, y se mantuvo en congelador de -80°C hasta su uso.

En la fase previa al desarrollo del estudio, se realizó una ecografía transrectal a las vacas para evaluar el estado de los ovarios y determinar en qué fase del ciclo estral se encontraban. En el caso de *Madroña* se encontró un cuerpo lúteo (CL) cavitario en el ovario derecho y un folículo preovulatorio de 15.4 mm de diámetro en ovario izquierdo por lo que se procedió a administrar vía i.m. 4 mL de PGF2α 0.075 mg/mL (Dalmaprost®, Fatro Ibérica, Barcelona) en dos dosis de 2 mL cada una, separadas 24 h.

Este fármaco es una prostaglandina sintética de última generación a base de D-cloprostenol, con actividad luteolítica y uterotónica. Asimismo, se aplicaron vía i.m. 4 mL de lecirelina 25 µg/mL (Dalmarelin®, Fatro Ibérica, Barcelona) también en dos dosis de 2 mL, con el objetivo de inducir la ovulación. La lecirelina es un análogo de la GnRH con acción sobre el eje hipotálamo-hipófisis. En el caso de *Unicornio*, en el ovario derecho se detectó un folículo preovulatorio de 12.5 mm de diámetro, en el ovario izquierdo un CL en regresión y se apreció un útero con signos de celo, por lo que se inyectaron 2 mL de Dalmarelin®, vía i.m.

Veinticuatro horas después de la administración de PGF2α y GnRH, se aplicó a ambas vacas la primera inyección de FSHrb. Se administró una dosis de 800 UI de FSHrb por vaca en una única inyección en un volumen total de 5 ml (1 ml de FSHrb + 4 ml de solución salina), vía i.m. Posteriormente, cada vaca se sometió a 4 sesiones de OPU entre el 19/05 y el 05/06 de 2025 (Tabla 2).

Tabla 2. Planificación del protocolo de estimulación de las vacas M-L.

Día	Procedimiento
	Ecografía inicial
Jueves 15/05 (20:00 h)	2 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®)
	2 mL PGF2α (Dalmaprost®)
Viernes 16/05 (20:00 h)	2 mL GnRH (Dalmarelin®) 5 mL FSHrb (800 UI)
Lunes 19/05 (9:00 h)	1ª OPU
	2 mL PGF2α (Dalmaprost®)
Viernes 23/05 (20:00 h)	4 mL GnRH (Dalmarelin®) 5 mL FSHrb (800 UI)
Lunes 26/05 (9:00 h)	2ª OPU
Sábado 31/05 (8:00 h)	5 mL FSHrb (800 UI)
Lunes 02/06 (9:00 h)	3ª OPU
Miércoles 04/06 (10:00 h)	Ecografía de seguimiento
Jueves 05/06 (9:00 h)	4ª OPU

3. Seguimiento ecográfico

Los animales fueron trasladados a la sala de exploración de la nave de bovino de la GDV, que dispone de un potro de contención con medidas de seguridad adecuadas para limitar los movimientos excesivos del animal, facilitando así la correcta ejecución del examen ecográfico, lo que ayuda a evitar interferencias que puedan dificultar la interpretación de las imágenes ultrasonográficas.

Como parte de la preparación de la donante, antes de la utilización del ecógrafo, se procedió al vaciado y limpieza de la cavidad rectal. El propósito fue optimizar el contacto entre el transductor y la mucosa rectal para obtener una mejor calidad de imagen. Seguidamente, se realizó una palpación y examen rectal del ovario para su localización.

Para las evaluaciones ecográficas vía endorrectal, se empleó un ecógrafo portátil DP-50 Vet Mindray (Mindray, Shenzhen, China) equipado con una sonda lineal endorrectal operando a 5–7.5 MHz. El seguimiento ecográfico se inició el mismo día que comenzó el protocolo hormonal, con el fin de determinar el estado ovárico previo al inicio del tratamiento. El examen ecográfico de los ovarios siempre se comenzó con el ovario derecho. Una vez localizados los ovarios mediante ecografía, se llevó a cabo la observación de los folículos en desarrollo, folículos dominantes y la posible presencia de CLs.

4. Punción folicular (OPU)

Las vacas donantes se ubicaron en el potro de contención y se aseguraron con cintas de sujeción. Posteriormente, se procedió a administrar xilacina (Xilagesic®, Calier, Barcelona), un tranquilizante a dosis de 0.25 mL/100 kg p.v. en un volumen de 0.9 mL vía i.m. Se dejó actuar unos minutos y posteriormente, se preparó la zona entre la 4ª vertebra sacra y la 2ª coxígea para la administración de la anestesia epidural

a base de la combinación de lidocaína 2% y adrenalina (20 mg/mL + 0.02 mg/mL, Anesvet, Ovejero, León) en un volumen de 5 mL. Una vez anestesiado el animal, se procedió a vaciar el recto y limpiar la zona perineal y la vulva con agua tibia y jabón para iniciar el procedimiento de OPU.

Para ello, se empleó un ecógrafo Falco-Vet (Esaote-Pie Medical, Maastricht, Holanda), dotado de sonda transvaginal (Pie Medical R-10) de 7.5 MHz y un mango (*handgrip*) de OPU de 60 cm de longitud, donde se colocaba la sonda y por donde se hacía pasar la guía de punción. Para la punción se usaron agujas desechables (18G, 1.2 x 40 mm) ajustadas en el extremo de la guía y conectadas mediante una cánula de teflón a un tubo estéril de recogida de 50 mL. Finalmente, el sistema se completaba con una bomba de vacío (Aspirator 3, Labotect, Göttingen, Alemania) accionada por pedal, aplicando una presión constante de 70 mm de Hg y un flujo de 20 mL/min.

Se aplicó povidona yodada como antiséptico en la zona vulvar y se introdujo el mango por vía vaginal. Con la mano izquierda, mediante palpación rectal, se acercaron los ovarios a la sonda y con la derecha se manipuló el mango. Una vez obtenida la imagen del ovario, se realizó la punción de los folículos y se aspiró su contenido presionando el pedal de la bomba. El contenido folicular se recogió en tubos Corning de 50 mL, mediante lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS; *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich) suplementada con heparina al 0.01% (Thermo Scientific Chemicals) y 1% de suero bovino fetal (SBF, Capricorn Scientific), mantenidos a 38°C en baño termostático. Conforme se llenaban los tubos, se transportaron al laboratorio anexo a la sala de exploración para la recuperación de los ovocitos. Al finalizar cada sesión de OPU, a los animales se les administró 20 ml de ácido tolfenámico, vía i.m. (Algenamic®, Fatro Ibérica, Barcelona) como analgésico y antiinflamatorio.

5. Clasificación de los ovocitos

En el laboratorio, el contenido de los tubos se pasó por un filtro de 50 μm de diámetro y los restos de sangre se eliminaron mediante lavados repetidos con medio de recolección. A continuación, se procedió a la búsqueda y selección de los ovocitos en lupa estereoscópica con una placa calefactada a 38°C. Posteriormente, los CCOs se lavaron en medio COW-WASH-LYO® (Embryocloud) y se transfirieron a criotubos con ese mismo medio para ser transportados en un incubador portátil (Embryonentransp, Minitube, Tiefenbach, Alemania) al laboratorio de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, donde se clasificaron según la Tabla 1. Los CCOs obtenidos fueron utilizados para calcular el número y grado de ovocitos recuperados por animal donante y sesión de OPU.

6. Maduración *in vitro* (MIV)

Los CCOs obtenidos se clasificaron en grados I, II, III, IV, degenerados y madurados *in vivo*, se lavaron, y aquellos que se consideraron viables se dispusieron para MIV en medio de maduración (COW-IVM-LYO®, EmbryoCloud) en gotas de 40 μL del mismo medio cubiertas por aceite de parafina (NidOil, Nidacon), en grupos de máximo 10 CCOs según su clasificación, a 38.5°C y 5% CO_2 durante 22 h, tras lo cual se procedió a su vitrificación.

7. Vitrificación de ovocitos

Para la vitrificación, los ovocitos fueron expuestos secuencialmente a diferentes soluciones para preparar progresivamente a la célula para el proceso de criopreservación en nitrógeno líquido (N_2L), minimizando el daño celular producido por la formación de cristales de hielo y el estrés osmótico. Las soluciones de trabajo fueron las siguientes:

- 1ª solución: TCM-199 (*Tissue Culture Medium 199*) tamponado con HEPES

(Ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico) + SBF. Esta solución permite el acondicionamiento inicial del ovocito antes de la exposición a los crioprotectores. El medio TCM-199 mantiene el equilibrio iónico y el pH, mientras que el SBF al 20% aporta proteínas que estabilizan la membrana celular, protegen el citoesqueleto y ayudan a mantener la integridad de la zona pelúcida durante el proceso de vitrificación.

- 2ª solución: 1ª solución + etilenglicol (7.5%) + dimetilsulfóxido (DMSO, (7.5%): En este paso, se realiza la preparación osmótica de la célula. El etilenglicol y el DMSO son crioprotectores permeables que empiezan a ingresar lentamente al ovocito para reemplazar el H_2O intracelular, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares.
- 3ª solución: 1ª solución + sacarosa (0.5 M) + etilenglicol (15%) + DMSO (15%): Esta solución contiene mayores concentraciones de crioprotectores permeables y prepara al ovocito para la vitrificación propiamente dicha. En este punto, el H_2O intracelular ha sido reemplazada casi por completo, permitiendo que, al ser sumergido en N_2L , el citoplasma vitrifique sin formación de hielo, lo que resulta crítico para la supervivencia celular. La sacarosa, un crioprotector no permeable, favorece la salida controlada de H_2O de la célula por ósmosis, reduciendo el volumen celular de forma segura.

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS 28.0.1.0 (SPSS, Chicago, IL, EEUU). Se compararon los datos de las variables experimentales para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de calidad ovocitaria, el número total

de ovocitos viables y el número total de ovocitos recuperados, entre las dos vacas (*Madroña* vs *Unicornio*), mediante estimulación con FSHrb. Además, se realizó el estudio estadístico comparativo para el número total de ovocitos de las 2 vacas y por cada vaca según la hormona empleada para la estimulación hormonal (FSHp vs FSHrb). Los datos relativos a la estimulación hormonal con FSHp fueron tomados del estudio publicado por Metony *et al.* (2025), así como de la información proporcionada por los cotutores del presente trabajo, quienes también participaron en dicho estudio.

La normalidad y la homogeneidad o igualdad de las varianzas se comprobaron mediante las pruebas de *Shapiro-Wilk* y *Levene*, respectivamente. Tras ambas, se aplicó un análisis *t* de *Student*. Cuando no se cumplían las pruebas de normalidad y de homogeneidad, se utilizó el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Las diferencias $p < 0.1$ se consideraron como tendencia.

RESULTADOS

1. Estimulación ovárica con FSHrb

En este estudio, tras realizar 4 sesiones de OPU por vaca, se obtuvieron un total de 104 ovocitos, de los cuales 45 (43.27%) correspondieron a *Madroña* y 59 (56.73%) a *Unicornio*. Del total de ovocitos obtenidos, 56 fueron viables (53.85%), correspondiendo 24 a *Madroña* (42.86% sobre el total de viables) y 32 a *Unicornio* (57.14% sobre el total de viables), respectivamente. La media $\pm$ desviación estándar (DS) del total de ovocitos recuperados por sesión de OPU de *Madroña* fue de 11.25 ± 1.50 y para *Unicornio* de 14.75 ± 6.90 . De igual manera, la media $\pm$ DS de ovocitos viables obtenidos por sesión de OPU de *Madroña* fue 6.00 ± 2.00 y de 8.00 ± 4.97 para *Unicornio*, respectivamente.

Del total de los 104 ovocitos obtenidos, 65 ovocitos (62.5%) se vitrificaron y conservaron

en N₂L. De ellos, 31 correspondieron a *Madroña* (29.81% del número de ovocitos totales y 47.69% de los vitrificados); y 34 fueron de *Unicornio* (32.69% y 52.31%, respectivamente).

Si se tienen en cuenta los ovocitos madurados *in vivo* obtenidos por OPU, el número total de ovocitos asciende a 118. De los cuales, *Madroña* aportó 2 ovocitos madurados *in vivo* (1 en la 2ª OPU y 1 en la 3ª), para un total de 47 ovocitos totales (39.83%), con una media de 11.75 ± 1.5 por sesión/OPU. *Unicornio* aportó 12 ovocitos madurados *in vivo* (3 en la 2ª sesión de OPU y 9 en la 3ª), para un total de 71 ovocitos totales (60.17%) con una media de 17.75 ± 5.80 por sesión/OPU.

Según los resultados presentados en la Tabla 3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con la calidad ovocitaria entre *Madroña* y *Unicornio*, ya que en todos los casos el *p*-valor fue superior a 0.05. Estos resultados sugieren una respuesta ovocitaria comparable entre ambos animales en términos de calidad.

2. Estudio comparativo de la estimulación ovárica FSHp vs FSHrb

Se han comparado los resultados obtenidos en el presente estudio con FSHrb con los del trabajo de Metony *et al.* (2025), realizado con estimulación mediante FSHp (Pluset®) y cuyos datos se resumen en la Tabla 4. Ambos estudios se realizaron en las mismas vacas y el protocolo hormonal se administró durante los mismos meses, pero con un año de diferencia.

El número de ovocitos obtenidos de grados III y IV fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos hormonales (FSHrb vs FSHp) en ambas vacas. El protocolo con FSHp produjo un mayor número de ovocitos de grado III ($p = 0.003$), mientras que la aplicación de FSHrb resultó en una mayor proporción de ovocitos de grado IV ($p = 0.001$).

El número de ovocitos de grado I obtenidos en *Unicornio* mostró una tendencia hacia la sig-

Tabla 3. Resultados de calidad ovocitaria con estimulación ovárica por FSHrb.

Calidad ovo	Nº ovo Total	¹ Media ± DS Total	Nº ovo Madroña	² Media ± DS Madroña	Nº ovo Unicornio	³ Media ± DS Unicornio	p valor Madroña vs Unicornio
Grado I	11	1.37 ± 1.51	5	1.25 ± 1.89	6	1.50 ± 1.29	0.417
Grado II	27	3.37 ±1.92	12	3.00 ± 1.41	15	3.75 ± 2.50	0.310
Grado III	18	2.88 ± 1.64	7	1.75 ± 1.26	11	2.75 ± 2.06	0.220
Grado IV	43	5.,37 ± 1.92	20	5.00 ± 0.82	23	5.75 ± 2.75	0.316
DEG	5	0.62 ± 0.74	1	0.25 ± 0.50	4	1.00 ± 0.82	0.200
Total Viables	56	7.00 ± 3.67	24	6.00 ± 2.00	32	8.00 ± 4.97	1.000
Total ovocitos	104	13.00 ± 4.99	45	11.25 ± 1.50	59	14.75 ± 6.90	0.180

¹Media ± DS Total: Media ± DS del total de animales/sesión OPU. ²Media ± DS Madroña: Media ± DS de Madroña/sesión OPU. ³Media ± DS Unicornio: Media ± DS de Unicornio/sesión OPU. DEG: ovocitos degenerados.

Tabla 4. Resultados de calidad ovocitaria comparando estimulación ovárica de FSHp vs FSHrb.

FSHp vs FSHrb /Calidad	Nº ovo Total	¹ Media ± DS Total	p valor	Nº ovo Madroña	² Media ± DS Madroña	p valor	Nº ovo Unicornio	³ Media ± DS Unicornio	p valor
FSHp Grado I	18	2.25 ± 1.83	0.157	4	1.00 ± 0.82	0.408	14	3.50 ± 1.73	0.057**
FSHrb Grado I	11	1.37 ± 1.51		5	1.25 ± 1.89		6	1.50 ± 1.29	
FSHp Grado II	31	3.87 ± 3.64	0.959	10	2.50 ± 1.91	0.345	21	5.25 ± 4.72	0.297
FSHrb Grado II	27	3.37 ± 1.92		12	3.00 ± 1.41		15	3.75 ± 2.50	
FSHp Grado III	36	5.37 ± 2.13	0.003*	15	3.75 ± 0.50	0.029*	28	7.00 ± 1.83	0.011*
FSHrb Grado III	18	2.25 ± 1.67		7	1.75 ± 1.26		11	2.75 ± 2.06	
FSHp Grado IV	7	1.00 ± 0.76	0.001*	4	1.00 ± 0.82	0.001*	3	1.00 ± 0.82	0.018*
FSHrb Grado IV	43	5.37 ± 1.92		20	5.00 ± 0.82		23	5.75 ± 2.75	
FSHp DEG	9	1.00 ± 1.60	1.000	4	1.,00 ± 1.41	0.486	5	1.00 ± 2.00	0.500
FSHrb DEG	5	0.62 ± 0.74		1	0.25 ± 0.50		4	1.00 ± 0.82	
FSHp Total Viables	92	11.50 ± 6.97	0.083**	29	7.25 ± 2.06	0.343	63	15.75 ± 7.80	0.072**
FSHrb Total Viables	56	7.00 ± 3.67		24	6.00 ± 2.00		32	8.00 ± 4.97	
FSHp Total ovocitos	108	13.50 ± 6.72	0.798	37	9.25 ± 3.10	0.145	71	17.75 ± 6.90	0.686
FSHrb Total ovocitos	104	13.00 ± 4.99		45	11.25 ± 1.50		59	14.75 ± 6.90	

¹Media ± DS total: Media ± DS del total de animales/sesión OPU. ²Media ± DS Madroña: Media ± DS de Madroña/sesión OPU. ³Media ± DS Unicornio: Media ± DS de Unicornio/sesión OPU. *: diferencias significativas $p < 0.05$. **: tendencia a la significación $p < 0.1$.

nificación estadística ($p = 0.057$), siendo mayor con el tratamiento de FSHp. De forma similar, el total de ovocitos viables obtenidos en ambas vacas también presentó una tendencia estadística ($p = 0.083$) a ser superior con FSHp, lo que sugiere un posible efecto del tipo de FSH sobre la calidad ovocitaria en estos parámetros. En cambio, para los ovocitos de grado II, degenerados (DEG) y para el total de ovocitos por sesión no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que indica que estas variables no se vieron claramente afectadas por el tratamiento hormonal empleado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la superestimulación ovárica con una única dosis de FSHrb generó una respuesta folicular moderada, con una proporción significativa de ovocitos de grados II y IV. Cabe señalar que, en la 2ª y 3ª sesión de OPU, se recuperaron varios ovocitos madurados *in vivo*, que siguiendo la clasificación de Demetrio & Barfield (2021), se clasificaron como grado IV, pero que debido a su viabilidad y buena calidad se procedió a su vitrificación inmediata, sin pasar por el proceso de MIV.

Este hallazgo permite considerar que la FSHrb podría tener una vida media más prolongada que la FSHp, lo que habría inducido una estimulación folicular más duradera y, en consecuencia, una maduración ovocitaria anticipada. En otras palabras, los procedimientos de OPU podrían haberse realizado demasiado tarde respecto al pico de maduración, lo que explicaría el mayor número de ovocitos demasiado avanzados en su desarrollo madurativo. Por este motivo, se decidió realizar un ajuste de última hora en el protocolo, omitiendo la administración de la última dosis de FSHrb con el fin de evitar una maduración ovocitaria excesiva antes de la OPU. Por ello, se optó por suspender la última administración de FSHrb y a pesar de ello, se obtuvo un rendimiento folicular semejante a las sesiones realizadas con estimulación previa.

Resultados similares fueron descritos por Gutiérrez-Reinoso et al. (2022) quienes estudiaron la respuesta de FSHrb en 68 vacas *Red Angus*, observando elevados niveles de esta hormona en sangre hasta el día 8 del protocolo.

Morera-Jiménez et al. (2022) emplearon FSHp (Folltropin®) y, en cuanto a sus resultados, puede destacarse que el porcentaje de ovocitos viables fue similar al obtenido en el presente estudio (56.6% con FSHp vs 53.8% con FSHrb). No obstante, el porcentaje de ovocitos grado I obtenido con FSHp fue superior (27.7%) al conseguido en el protocolo basado en FSHrb (10.6%) empleado en el presente trabajo.

Estos resultados también se han contrastado con los conseguidos por Metony et al. (2025), en un estudio publicado en *Anales de Veterinaria (Murcia)*, con estimulación hormonal mediante FSHp (Pluset®), de modo que la calidad ovocitaria obtenida con una única dosis de FSHrb fue ligeramente inferior, aunque se mantuvo un rendimiento equiparable. Ambos trabajos utilizaron los mismos animales y se desarrollaron en un intervalo de tiempo similar, con la diferencia temporal de un año, lo que permite realizar una comparación directa de los efectos hormonales bajo condiciones controladas. Esta comparación resulta relevante para valorar la consistencia de los resultados y la posible influencia del tratamiento sobre la respuesta ovárica.

Además, desde una perspectiva práctica, el uso de una única inyección de FSHrb conlleva ventajas logísticas y de bienestar animal frente a los protocolos tradicionales con FSHp, que requieren múltiples administraciones distribuidas a lo largo de varios días dependiendo del protocolo empleado. Esta simplificación en la administración reduce significativamente el estrés asociado a la manipulación repetida del animal, disminuye el riesgo de lesiones en el punto de inyección y reduce la necesidad de intervención continuada por parte del personal técnico. Estos aspectos adquieren especial relevancia en condiciones de producción real, donde la eficiencia operaria y el bienestar animal son factores cla-

ve que influyen tanto en la toma de decisiones como en la calidad de los resultados.

En esta misma línea, Carvalho et al. (2014) concluyeron que una única inyección de FSHrb fue capaz de inducir una superovulación y producir un número similar de embriones de buena calidad en novillas Holstein en comparación con un protocolo estándar de FSH derivado de hipófisis porcinas que requirió 8 inyecciones a lo largo de 4 días.

Una limitación relevante del presente estudio es el bajo número de animales incluidos en el mismo, lo que podría afectar a la robustez estadística de los resultados. Además, no se evaluó el desarrollo embrionario posterior, por lo que no puede establecerse una relación directa entre la calidad ovocitaria y el éxito reproductivo final.

A pesar de sus limitaciones, el presente trabajo aporta datos preliminares sobre la eficacia de FSHrb en protocolos de superestimulación ovárica en vacas de raza M-L. Sería conveniente realizar estudios adicionales con un mayor número de animales y evaluar el rendimiento embrionario y de gestación para determinar la viabilidad práctica de esta hormona en programas de reproducción asistida.

A raíz de los resultados obtenidos y la observación de una posible vida media prolongada de FSHrb, se propone explorar un nuevo protocolo que podría optimizar el momento de aspiración y evitar la maduración ovocitaria excesiva. Dicho protocolo consistiría en una única inyección de FSHrb administrada un sábado, seguida de dos sesiones de OPU en las jornadas de lunes y jueves, y posteriormente, una semana de descanso. Este esquema permitiría ajustar mejor el momento de recuperación ovocitaria al pico de estimulación, evaluando así la sincronización hormonal y la calidad ovocitaria en un marco más eficiente.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se han llevado a cabo 4 sesiones de OPU con estimulación hormonal mediante la administración de una única dosis

de FSHrb en vacas de raza M-L, en peligro de extinción, con el objetivo de recuperar el mayor número posible de ovocitos viables para su posterior maduración *in vitro* y conservación mediante vitrificación.

Los resultados obtenidos muestran que la superestimulación ovárica con una única dosis de FSHrb produjo, en las vacas de raza M-L de nuestro estudio, una respuesta folicular moderada, con una proporción significativa de ovocitos grados II y IV.

En el estudio comparativo realizado entre los resultados de Metony et al. (2025) con estimulación mediante FSHp (Pluset®) en los mismos animales en 2024, y nuestros resultados de calidad ovocitaria, obtenidos con una sola dosis de FSHrb, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas para los ovocitos grados I, II, y degenerados, así como tampoco en el número total de ovocitos viables y en el número total de ovocitos obtenidos.

AGRADECIMIENTOS

A AVAMUR por la donación de las vacas de raza Murciano-Levantina y al personal de la GDV de la UMU por su ayuda en la manipulación de las mismas. A D. José Meroño (*Fatro Ibérica*, Delegación de Murcia) por la donación de Dalmarelin®, Dalmaprost® y Algenamic® y a *Embryocloud* por la donación de los medios de lavado y de MIV. Al Prof. D. Francisco A. García-Vázquez por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

REFERENCIAS

1. Allcca, Y., Rodríguez, A., Pozo, A., Herrera, A. & Sulca, L. (2023). Respuesta ovárica y embrionaria de dos protocolos de superovulación en bovinos altoandinos Pardo Suizo. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 25(1), 49–55. <https://doi.org/10.18271/ria.2023.490>
2. Almela, L., Poto, A., Galián, S., Ruiz, S., Romero, J., & Peinado, B. (2011). Murcia

- se esfuerza por la supervivencia de su raza bovina autóctona. *Albéitar*, 143, 18–20.
3. Almela, L., Poto, A., Galián, S., & Peinado, B. (2025). Reproductive studies in the native breeds of the region of Murcia: Current and future status of the IMIDA Animal Germplasm Bank. In J. C. Gardón & K. Satué (Eds.), *Assisted reproductive technologies in animals* (Vol. 2, pp. 165–182). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-031-87198-6_5
 4. Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard, M. A. (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 66(1), 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>
 5. Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>
 6. Carvalho, P. D., Hackbart, K., Bender, R., Baez, G. M., Dresch, A. R., Guenther, J., et al. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*, 82(3), 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>
 7. Cavalieri, F. L. B., Morotti, F., Seneda, M. M., Colombo, A. H. B., Andreazzi, M. A., Emanuelli, I. P., et al. (2018). Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 117, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>
 8. Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C., & Gerlinger, P. (1984). Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fertility and Sterility*, 44(5), 656–660. [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)48983-1/pdf](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)48983-1/pdf)
 9. Demetrio, D. G. B., & Barfield, J. (2021). Appendix 2: Photographic illustrations of bovine cumulus–oocyte complexes. In *International Embryo Transfer Society Manual* (5th ed., pp. 1–12).
 10. Demetrio, D., Hasler, J. F., Oliveira, M. E., Demétrio, C. G., Fonseca, J., & Santos, R. M. (2021). Comparison of single to multiple injections of follicle-stimulating hormone before ovum pickup in Holstein heifers: Oocyte recovery and embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*, 33, 180–181. <https://doi.org/10.1071/RDV33N2AB145>
 11. Fry, R. C. (2020). Gonadotropin priming before OPU: What are the benefits in cows and calves? *Theriogenology*, 150, 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.087>
 12. Gutiérrez-Reinoso, M. A., Aguilera, C. J., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F. O., Cabezas, I., et al. (2022). Effects of extra-long-acting recombinant bovine FSH (bscrFSH) on cattle superovulation. *Animals*, 12, 153. <https://doi.org/10.3390/ani12020153>
 13. Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)
 14. Machatkova, M., Jokesova, E., Horky, F., & Krepelova, A. (2000). Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology*, 54(4), 543–550. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00369-1)
 15. Martemucci, G., & D'Alessandro, A. G. (2013). Efficiency of FSH/LH treatments for *in vivo* production of embryos and their cryopreservation by different methods in goats. *Small Ruminant Research*, 114(2–3), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.06.007>
 16. Metony, O., Heras, S., Ramal, I., Romero-Aguirregomezcorta, J., & Ruiz, S. (2025). Rendimiento de OPU en vacas de raza

- Murciano-Levantina: Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSHp (Pluset®). *Anales de Veterinaria de Murcia*, 39, 1–15. <https://doi.org/10.6018/analesvet.631631>
17. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAPA). (2024). *Resultados de las encuestas de ganado bovino*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/>
 18. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAPA). (2025). *Situación de mercado: Sector vacuno de carne*. Madrid, España. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/vacuno-de-carne/informacion-del-sector/>
 19. Morera-Jiménez, A., Velasco-García, E., Heras, S., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (Follitropin®) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 36, 1–17. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
 20. Motta, J. C. L., Hayden, C. B., Sala, R. V., Ross, P. J., & García-Guerra, Á. (2025). Advances in synchronization and superstimulation for OPU/IVF: Optimizing oocyte quantity and quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 37, RD24143. <https://doi.org/10.1071/RD24143>
 21. Nivet, A. L., Bunel, A., Labrecque, R., Belanger, J., Vigneault, C., Blondin, P., et al. (2012). FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, 143(2), 165–171. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0391>
 22. Ongaratto, F. L., Cedeño, A. V., Rodríguez-Villamil, P., Tríbulo, A., & Bó, G. A. (2020). Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and *in vitro* embryo production in beef donor cows. *Animal Reproduction Science*, 220, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>
 23. Ruiz, S. (2014). OPU (Ovum Pick Up) en bovinos. *Mundo Ganadero*, 261, 14–22.
 24. Ruiz, S. (2020). Ovum Pick-Up (OPU) in cattle: An update. In J. C. Gardón & K. Satué (Eds.), *Biotechnologies applied to animal reproduction: Current trends and practical applications for reproductive management* (pp. 139–183). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780367817527-7>
 25. Ruiz, S., & Poto, A. (2017). La raza bovina Murciano-Levantina: Presente y futuro. *Boletín Foro Agro Ganadero*.
 26. Santos, M. V., Neta, L. B., Borges, A. A., & Pereira, A. F. (2017). Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Semina: Ciências Agrárias*, 38, 1393–1402. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n3p1393>
 27. Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M. A., Dupont, J., Fortune, J. E., et al. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 444–467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>
 28. Seneda, M. M., Esper, C. R., Garcia, J. M., Oliveira, J. A., & Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 67(1–2), 37–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00113-0)
 29. Sirard, M. A., Picard, L., Dery, M., Coenen, K., & Blondin, P. (1999). The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, 51(4), 699–708. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00019-9)
 30. Wrenzycki, C. (2018). Gene expression analysis and *in vitro* production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 14–19. <https://doi.org/10.1111/rda.13260>