

ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN VACAS DE RAZA MURCIANO-LEVANTINA: USO DE FSH RECOMBINANTE BOVINA Y COMPLEJO VITAMÍNICO AD₃E

Ovarian stimulation in Murciano-Levantina cows: use of recombinant bovine FSH and AD₃E vitamin complex

Biosca, J.A.; Heras, S.; Ramal, I.; Ruiz, S.*

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

***Autor de correspondencia:** Ruiz, S.: sruiz@um.es

Tipo de trabajo: Trabajo de Fin de Grado (Veterinaria).

Recibido: 21/09/2026

Aceptado: 24/09/2026

RESUMEN

Este trabajo analizó, en vacas de raza Murciano-Levantina, la respuesta a la estimulación ovárica tras la administración de una dosis única de FSH recombinante bovina (FSHrb) y de un complejo vitamínico AD₃E, determinando la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos mediante OPU (*Ovum Pick-Up*).

Para ello, se seleccionaron dos vacas donantes, *Madroña* (vaca 1) y *Jardinera* (vaca 2), con 15 y 18 años, respectivamente, a las que se les aplicó una dosis única de FSHrb (600 UI) como estimulación hormonal junto con un complejo vitamínico AD₃E durante 2 semanas, con 4 sesiones OPU/animal. Los ovocitos obtenidos se clasificaron, según su calidad, en Grados I a IV y degenerados, seleccionándose sólo ovocitos Grados I a III para su vitrificación y futuro uso en la producción de embriones *in vitro*.

Se obtuvieron un total de 94 ovocitos, 81 de la vaca 1 (86.17%) y 13 de la 2 (13.83%). Observándose una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.038$) en favor de la vaca 1 (20.25 ± 12.71) frente a la 2 (3.25 ± 1.71), cuyo bajo rendimiento probablemente se asocie a su senescencia reproductiva. Del total de ovocitos obtenido de ambas donantes, 53 fueron viables (56.38%) y se vitrificaron 59 (62.77%).

Estos resultados ponen de manifiesto que la administración de una dosis única de FSHrb más un complejo vitamínico AD₃E y la realización de 2 sesiones de OPU/semana, optimizan significativamente el rendimiento

cuantitativo de la técnica. En el caso de la vaca 1, se observó un incremento del 119% en el total de ovocitos recuperados respecto al protocolo empleado en este mismo animal en 2024 (Metony et al., 2025) (pasando de 9.25 ± 3.10 a 20.25 ± 12.71), duplicando, además el número total de ovocitos Grado I. Aunque estadísticamente estas diferencias se mantienen como tendencias debido a la alta variabilidad inter-sesión, biológicamente los datos sugieren una mayor eficiencia en el reclutamiento folicular.

Palabras clave: bovino, raza Murciano-Levantina, estimulación ovárica, FSHrb, complejo vitamínico AD₃E, OPU, calidad ovocitaria.

ABSTRACT

This study investigated, in Murciano-Levantina cows, the response to ovarian stimulation following the administration of a single dose of recombinant bovine FSH (rbFSH) and a vitamin AD₃E complex, and to determine the quantity and quality of the oocytes obtained via OPU (Ovum Pick-Up).

Two donor cows, named *Madroña* (cow 1) and *Jardinera* (cow 2), aged 15 and 18 years respectively, were selected. They were administered a single dose of rbFSH (600 IU) as hormonal stimulation, together with a vitamin complex AD₃E, over a period of 2 weeks, with 4 OPU sessions per animal. The oocytes obtained were graded according to quality as Grades I to IV and degenerate, with only Grade I to III oocytes being selected for vitrification and future use for *in vitro* embryo production.

A total of 94 oocytes were obtained, 81 from the cow 1 (86.17%) and 13 from the cow 2 (13.83%). A statistically significant difference ($p=0.038$) was observed in favour of the cow 1 (20.25 ± 12.71) compared with the cow 2 (3.25 ± 1.71), whose low yield is likely to be associated with her reproductive senescence. Of the total oocytes obtained from both donors, 53 were viable (56.38%) and 59 were vitrified (62.77%).

The findings of this study demonstrate that the administration of a single dose of rbFSH together with an AD₃E vitamin complex, combined with 2 OPU sessions per week, significantly optimises the quantitative yield of the technique. In the cow 1, a 119% increase was observed in the total number of oocytes retrieved compared with the protocol used in this same animal in 2024 (Metony et al., 2025) (rising from 9.25 ± 3.10 to 20.25 ± 12.71), whilst also doubling the total number of Grade I oocytes. Although statistically these differences remain as trends due to high inter-session variability, biologically the data suggest greater efficiency in follicular recruitment.

Keywords: bovine, Murciano-Levantina breed, ovarian stimulation, rbFSH, AD₃E vitamin complex, OPU, oocyte quality.

INTRODUCCIÓN

La raza bovina Murciano-Levantina (M-L) es una raza autóctona del Levante español, que descende del *Bos Taurus frontosus* junto con *B. Taurus brachicero* (Aparicio, 1960). Son ejemplares de trabajo-carne, que tienen un tamaño medio, capa castaña y perfil convexo, con encornadura en rueda lateral y con un carácter tranquilo y dócil que facilita su manejo. Por desgracia, hoy en día esta raza se encuentra en peligro de extinción debido al desarrollo de la maquinaria agrícola y la difusión de otras razas cárnicas de mayor rendimiento; quedando tan solo 40 animales ubicados en las provincias de Almería, Alicante y Murcia (España), en un to-

tal de 9 ganaderías (MAPA, 2025). Por ello, la Asociación de Criadores de la Raza Murciano-Levantina (AVAMUR) se encarga de promover su conservación y recuperación. Sin embargo, el reducido tamaño poblacional y el consecuente riesgo de consanguinidad hacen que los métodos reproductivos tradicionales resulten insuficientes para su recuperación.

Aquí es donde adquiere importancia el uso de biotecnologías reproductivas avanzadas, que son estrategias fundamentales para salvaguardar la viabilidad genética y preservación de poblaciones amenazadas (Metony et al., 2025). De cara a potenciar la variabilidad genética y dotar de mayores recursos al Banco de Germoplasma del Instituto Murciano de Investigación y De-

sarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), se vienen empleando diversas técnicas como, por ejemplo, la punción folicular transvaginal ecoguiada (*Ovum Pick-Up*, OPU), para obtener ovocitos de hembras donantes vivas, y posibilitar su posterior uso en procesos de maduración y fecundación *in vitro* (MIV/FIV) y/o criopreservación (Ruiz, 2020).

Aunque la OPU puede realizarse en ciclos naturales sin estimulación previa y sin costes operativos, este abordaje ofrece un bajo rendimiento cuantitativo por sesión. En este sentido, se ha demostrado que la OPU obtiene mejores resultados cuando las hembras donantes reciben un tratamiento de hormona folículo estimulante (FSH) para favorecer el desarrollo folicular (García-González et al., 2025) y que la estimulación hormonal previa a la OPU consigue mejorar la consistencia y el tamaño de los folículos disponibles (Romero et al., 2011). Dado que la reserva folicular de la donante es la principal fuente de variabilidad en el éxito de la OPU, el tratamiento ideal debe simular el pico endógeno de FSH previo a una onda folicular y mantener niveles plasmáticos elevados de esta hormona durante 72 h para asegurar el desarrollo folicular continuo (Bó & Mapletoft, 2020).

Los protocolos de estimulación hormonal varían según la hormona empleada, la dosificación y la pauta de administración, teniendo como objetivo maximizar el reclutamiento y crecimiento folicular en ambos ovarios de la donante.

Tradicionalmente la estimulación se ha llevado a cabo con el empleo de FSH de origen hipofisario porcino (FSHp). No obstante, la FSHp presenta desventajas sustanciales, como una vida media plasmática corta (que obliga a protocolos de administración seriada cada 12 h), riesgo de contaminación con hormona luteinizante (LH) y la posible inducción de respuesta inmune en el hospedador. Para solventar estas limitaciones, la biotecnología reproductiva ha desarrollado la hormona folículo estimulante recombinante bovina (FSHrb). Esta molécula carece de con-

taminación por LH y posee una elevada estabilidad biológica con una vida media superior a las 48 h (Gutiérrez et al., 2022). Estudios recientes demuestran que los parámetros de folículos aspirados, los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs) recuperados y las tasas de maduración de FSHrb son equiparables o superiores a los de FSHp (Chandana et al., 2026). Por tanto, la FSHrb constituye una alternativa eficiente que permite sustituir las inyecciones múltiples de FSHp, por una única dosis de acción prolongada, reduciendo así el estrés por manejo en las donantes (Chandana et al., 2026).

Estudios recientes han podido determinar que la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos por vaca mediante OPU se ve incrementada cuando además de la FSH se suplementa a las hembras donantes con un complejo vitamínico AD₃E (Xiao et al., 2026).

El estrés oxidativo se genera por un desequilibrio entre la producción fisiológica de radicales libres y los mecanismos antioxidantes celulares (Elejalde, 2001). Durante los procesos de ovulación y dinámica folicular, la acumulación excesiva de estas especies reactivas impacta negativamente en la fertilidad bovina, induciendo disfunción en el desarrollo folicular, mortalidad embrionaria temprana y una disminución de la calidad ovocitaria (Sarker et al., 2015).

Aunque la administración de FSH exógena es indispensable para la estimulación, se ha demostrado que su aplicación induce estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteraciones en los patrones de metilación que comprometen el desarrollo posterior del ovocito (Xiao et al., 2026). Para contrarrestar estos efectos citotóxicos, el uso combinado de un complejo vitamínico AD₃E actúa como un potente sistema antioxidante y eliminador de radicales libres en el microambiente ovárico (Sarker et al., 2015). Cada una de estas vitaminas cumple una función específica, así la vitamina A actúa de forma sinérgica con la vitamina E dentro del líquido folicular, modulando positivamente el potencial de desarrollo embrionario postfecundación. La

vitamina D evita el deterioro de la calidad ovocitaria al reducir los niveles de hormona anti-mülleriana y la vitamina E reduce la formación de radicales libres en los folículos dominantes, y por tanto disminuye el estrés oxidativo en las células de la granulosa.

La eficacia de esta estrategia antioxidante al inicio del protocolo hormonal ha sido validada por Xiao et al. (2026) en donantes bovinas. Tras la suplementación con AD₃E, estos autores registraron un incremento significativo en el número de folículos disponibles para punción (32.1 vs. 24.6), lo que se tradujo en una mayor tasa de recuperación de CCOs (9.0 vs. 6.4) y en un aumento en la proporción de ovocitos de alta calidad (Grados I y II), que ascendió del 49.0% al 57.6% (Xiao et al., 2026).

La OPU es un procedimiento no invasivo que permite recuperar ovocitos de folículos antrales en animales vivos (vacas, cerdas y yeguas), y también en humanos. Esta técnica permite obtener la mayor descendencia posible de animales con un alto valor genético y acelerar los procesos de selección y mejora genética. El instrumental básico consta de un ecógrafo equipado con un transductor intravaginal, un sistema de guía para agujas de punción (17-18G) y una bomba de vacío con regulación de la presión de succión (Bols & Stout, 2018). El sistema de recolección (un filtro de embriones convencional o un tubo Falcon sellado con un tapón de doble vía), se coloca entre la aguja de punción y la bomba de vacío, encargada de mantener una presión de succión continua y controlada, para evitar daños mecánicos en la zona pelúcida y en las células que rodean al CCO (Bols & Stout, 2018).

Sin duda una de las grandes ventajas de la OPU es su gran flexibilidad ejecutiva, su práctica sin estimulación hormonal no interfiere con el curso del ciclo estral propio de los animales evaluados, reduciendo costes asociados a fármacos, y reduce el riesgo de alteraciones ováricas. Si bien es cierto que la aplicación de tratamientos de estimulación hormonal sigue siendo

la estrategia de elección al aumentar el diámetro medio de los folículos y el rendimiento final de ovocitos por sesión (Ruiz, 2020).

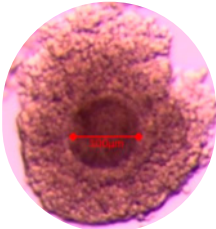
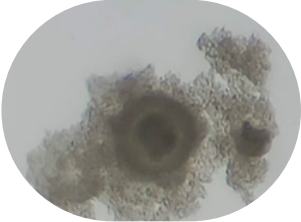
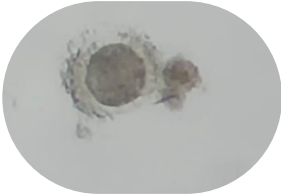
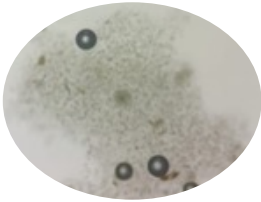
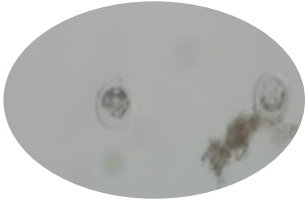
El protocolo práctico de la técnica comienza con un vaciado del recto del animal, y posterior limpieza exhaustiva de toda la zona perianal con agua y jabón. Mediante palpación se debe hacer una fijación rectal del ovario y posicionar la sonda ecográfica vía vaginal. Tras alinear los folículos antrales con la trayectoria de la guía de punción, se avanza la aguja para perforar la pared vaginal y penetrar en el antro folicular, activando la aspiración de la bomba de vacío mediante un pedal (Bols & Stout, 2018).

Para optimizar la tasa de ovocitos recuperados y evitar que los CCOs queden adheridos a las paredes del sistema de recolección, un ayudante debe realizar lavados continuos del sistema utilizando un medio tamponado heparinizado precalentado, y lo debe hacer de forma sistemática cada 3-4 folículos puncionados (Boni et al., 1999). Una vez finalizada la punción, se transfiere el contenido del tubo a una placa de Petri estéril y se somete a lavados sucesivos con un medio específico para posteriormente, mediante el uso de lupa estereoscópica pasar a la visualización y recuperación de los ovocitos obtenidos (Viana et al., 2010).

Se establecen 6 Grados para clasificar los CCOs obtenidos: Grado I, Grado II, Grado III, Grado IV, Degenerados y otras estructuras (Demetrio & Barfield, 2021; Tabla 1). Se consideran viables los ovocitos de Grados I, II y III.

Está demostrado que la nutrición, el estado fisiológico de las donantes, así como la estación del año pueden provocar diferencias de densidad y número de células del *cumulus* (Leroy et al., 2004). A su vez, la presencia o ausencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento hormonal altera los resultados de los programas de conservación de ovocitos. Se ha demostrado que la maduración *in vitro* de los ovocitos se ve afectada por la fase de dominancia folicular y los mecanismos bioquímicos que esta ejerce. Cuando el folículo dominante no está presente o

Tabla 1. Clasificación de los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs) (Demetrio & Barfield, 2021).
(Fuente imágenes: elaboración propia).

Grado	Imagen	Características
I		Más de 3 capas de células del <i>cumulus</i> completas y compactas. Ooplasma denso y uniforme.
II		1-2 capas de células del <i>cumulus</i> . Ooplasma denso y uniforme con granulación. Se incluyen ovocitos Grado I con ooplasma granulado.
III		Menos de 1 capa de células del <i>cumulus</i> . Ooplasma denso y uniforme. Se incluyen ovocitos Grado II con ooplasma granulado.
IV		Células del <i>cumulus</i> expandidas. Se incluyen ovocitos Grado III con ooplasma granulado.
DEG		Ooplasma retraído. Células del <i>cumulus</i> fusionadas. Zona pelúcida agrietada o vacía.

DEG: Degenerados.

se elimina al inicio de la OPU, se incrementa el número total de ovocitos recuperados; pasando de 5.9 a 7.6 ovocitos obtenidos por sesión de OPU (Merton et al., 2003).

Finalmente, cabe destacar que, aunque la clasificación morfológica por inspección visual de los ovocitos es el método de elección principal en biotecnologías reproductivas, éste presenta limitaciones intrínsecas por la subjetividad de cada operador (Reader et al., 2017).

El éxito de los programas de OPU está fuertemente condicionado por factores intrínsecos de la donante, destacando la raza y la edad. La raza determina particularidades fisiológicas y patrones neuroendocrinos específicos que modulan la población folicular antral y la tasa de recuperación ovocitaria (Pontes et al., 2011). En la literatura científica existe consenso sobre la superioridad cuantitativa de las subespecies *Bos indicus* frente a las de tronco *B. taurus* (Carvalho et al., 2008; Pontes et al., 2011). Las hembras *B. indicus* presentan una mayor frecuencia de ondas foliculares por ciclo y una reserva antral superior, alcanzando rendimientos de hasta 30 ovocitos por sesión de OPU; mientras que en genotipos *B. taurus* las tasas habituales de recuperación se restringen a rangos de entre 1.9 a 9.9 ovocitos por sesión (Pontes et al., 2011).

Por otra parte, la edad de la donante conlleva a cambios fisiológicos y anatómicos progresivos que alteran la dinámica ovárica, asociándose a una disminución de la reserva folicular y a una pérdida gradual de la calidad ovocitaria (Saldarriaga et al., 2007). A partir de los 5 años, se observa una relación negativa y constante entre la edad cronológica y el rendimiento ovocitario por desajustes hormonales (Builes-Higueta, 2025). En un análisis sobre 235 OPUs en vacas del tronco *B. indicus*, Builes-Higueta (2025) constató una tendencia decreciente en el número medio de ovocitos recuperados por sesión conforme avanzaba la edad de la donante, pasando de una media de 28.70 ovocitos/OPU en vacas de 1 a 3 años; a un valor medio de 18.06 ovocitos/OPU en vacas *B. Indicus* de más de 10 años.

La hipótesis de nuestro trabajo plantea que la administración conjunta de una sola administración de FSHrb y de un complejo vitamínico AD₃E, provocará una significativa estimulación ovárica, permitiendo realizar 2 sesiones OPU/semana, mejorando la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos. En este sentido, nuestro objetivo ha sido la evaluación de la eficacia del tratamiento de estimulación ovárica al aplicar una sola dosis de 600 UI de FSHrb junto con la suplementación de un complejo vitamínico AD₃E y la determinación de la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados por OPU en vacas de raza M-L.

Con ello se pretende verificar la viabilidad técnica de realizar 2 sesiones de OPU por semana (lunes/jueves) tras la aplicación de una única dosis de 600 UI de FSHrb, 48 h antes de la 1ª OPU. Analizar el efecto de la suplementación de un complejo vitamínico AD₃E, administrado de forma simultánea a la FSHrb, sobre la calidad de los ovocitos recuperados. Determinar el impacto de la variabilidad individual y de la edad de las hembras donantes sobre la tasa de recuperación y de desarrollo ovocitario y comparar el rendimiento del protocolo propuesto frente a los datos obtenidos en experiencias previas realizadas en la vaca 1 con FSHp (Metony et al., 2025) y con 800 UI de FSHrb y 1 OPU/semana (García-González et al., 2025). 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.

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, denominadas vaca 1 (*Madroña*) y vaca 2 (*Jardinera*). Ambas pertenecen a la Asociación de Criadores de la vaca M-L (AVAMUR) y se encuentran alojadas en las instalaciones de la nave de vacuno de la Granja Docente Veterinaria (GDV) de la UMU. La vaca 1 (Figura 1) de 15 años y 6-7 partos, ha participado ya en experiencias previas durante 2024 y 2025, mientras que la vaca 2 (Figura 2) de 18 años y múltipara, se encuentra 3 años sin criar y esta es su primera intervención en programas reproductivos.



Figura 1. Vaca 1 (*Madroña*).
(Fuente imagen: elaboración propia).



Figura 2. Vaca 2 (*Jardinera*).
(Fuente imagen: elaboración propia).

2. Evaluación ecográfica de las donantes

Previamente al inicio de la experiencia fue necesario realizar ecografías de revisión a ambos animales para determinar la fase del ciclo estral en que se encontraban. Los animales se trasladaron hasta el potro de inmovilización de la nave de vacuno de la GDV para ser examinados con el ecógrafo portátil DP-50 Vet Mindray (Mindray, Shenzhen, China) equipado con una sonda lineal transrectal de 5-7.5 MHz. Se comenzó con un vaciado del recto de heces previo a la exploración ecográfica, con localización y evaluación de las estructuras reproductivas por palpación antes de la ecografía. Posteriormente, se introdujo la sonda lineal vía transrectal y se comenzó evaluando el útero, cuerno uterino derecho y ovario derecho, seguido de cuerno uterino izquierdo y ovario izquierdo, cronológicamente.

En la vaca 1 se observaron folículos en crecimiento en ambos ovarios, siendo el ovario derecho el que presentaba el folículo preovulatorio de mayor desarrollo con 12 mm de diámetro, por lo que se le administró vía intramuscular (i.m.) 2 mL de lecorelina 25 µg/mL (Dalmarelin®, Fatro Ibérica, Barcelona, España). En el caso de la vaca 2 se encontró un folículo preovulatorio de 14 mm en el ovario derecho y un folículo de 24 mm, compatible con un quiste folicular, en el izquierdo, además de la presencia de líquido en el útero, por lo que se le administró vía i.m. 2 mL de Dalmarelin®. Este fármaco es un análogo de la GnRH con función sobre el eje hipotálamo-hipofisario para inducir la ovulación.

3. Protocolo de estimulación hormonal y suplementación vitamínica

Para el desarrollo del estudio se emplearon 600 UI de hormona FSH recombinante bovina (FSHrb), proporcionada por un laboratorio de biotecnología, y que actualmente se halla en proceso de desarrollo, por lo que toda la información respecto a la misma es confidencial. Los viales de FSHrb se recibieron liofilizados y se mantuvieron

en congelador a -80°C . Para su uso fue necesario realizar una reconstitución con 5 mL de suero salino fisiológico. Una vez reconstituida la hormona fue extraída del vial donde se conservaba para su administración a los animales.

A las 24 h de las sesiones ecográficas antes mencionadas, a ambos animales se les aplicó la primera administración de FSHrb, que consistió en una dosis única de 600 UI de FSHrb por vaca en un volumen total de 5 mL, vía i.m. De forma simultánea a la administración de FSHrb, se inyectaron vía i.m. 6 mL del complejo vitamínico AD₃E (Vetidina®, Fatro Ibérica, Barce-

lona, España), correspondientes a 300.000 UI de vitamina A, 450.000 UI de vitamina D₃ y 300 mg de vitamina E.

4. Sesiones de Ovum Pick-Up (OPU)

Pasadas 48 h de la administración de FHSrb y del complejo vitamínico, se procedió a la OPU (2 sesiones/semana, lunes y jueves), dejando 2 semanas de intervalo para la siguiente administración de hormona y Vetidina®, para completar 4 sesiones de OPU en el periodo de tiempo desde el 25/05 al 18/06 (Tabla 2).

Tabla 2. Planificación temporal del protocolo FSHrb+AD₃E de las vacas M-L sometidas a estudio.

Día	Vaca 1	Vaca 2
21/05/26	Ecografía inicial 2 mL GnRH (Dalmarelin®)	Ecografía inicial 2 mL GnRH (Dalmarelin®)
22/05/26	6 mL AD ₃ E (Vetidina®) 5 mL FSHrb (600 UI)	Ecografía 4 mL GnRH (Dalmarelin®) 6 mL AD ₃ E (Vetidina®) 5 mL FSHrb (600 UI)
25/05/26	1ª OPU	1ª OPU 6 mL AD ₃ E (Vetidina®) 5 mL FSHrb (800 UI)
28/05/26	2ª OPU	2ª OPU
05/06/26	Ecografía de revisión 5 mL PGF2α (Dalmaprost®) 4 mL GnRH (Dalmarelin®)	Ecografía de revisión
10/06/26	Ecografía de revisión 5 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®)	Ecografía de revisión 3 mL PGF2α (Dalmaprost®)
11/06/26	5 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®)	3 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®)
12/06/26	3 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®) 6 mL AD ₃ E (Vetidina®) 5 mL FSHrb (600 UI)	2 mL PGF2α (Dalmaprost®) 2 mL GnRH (Dalmarelin®) 6 mL AD ₃ E (Vetidina®) 5 mL FSHrb (600 UI)
15/06/26	3ª OPU	3ª OPU
18/06/26	4ª OPU	4ª OPU

Cabe mencionar, que en la 1ª sesión de OPU fue necesario aplicar a la vaca 2 otra dosis de FSHrb, que se mantenía almacenada del año anterior (800 UI) junto a la suplementación del complejo vitamínico AD₃E. Esto fue necesario debido a que al inicio del tratamiento presentaba un quiste folicular de gran tamaño, que liberaba grandes concentraciones de estrógenos y que podría haber suprimido el efecto de la primera dosis de FSHrb.

Para la OPU se introdujeron las vacas en el potro de contención, donde se les administró una dosis de xilacina 2% como tranquilizante (0.25 mL/100 kg p.v. Rompun®, Bayer, Barcelona, España), en un volumen de 1 mL vía i.m. Tras lo cual se procedió a depilar la zona del maslo de la cola para realizar la anestesia epidural. Para ello se empleó la combinación de lidocaína 2% y adrenalina (20 mg/mL+0,02 mg/mL) (Anesvet, Ovejero, León, España) en un volumen de 5 mL. La anestesia epidural se practicó entre la 4ª vértebra sacra y la 2ª coxígea, dejando al animal insensibilizado en la región posterior.

Es muy importante para esta técnica asegurar unas buenas condiciones de higiene y limpieza con agua y jabón junto con la aplicación de betadine en la vagina de la vaca. Para la OPU, se utilizó un ecógrafo Falco-Vet (Esaote-Pie Medical, Maastricht, Países Bajos), dotado de una sonda transvaginal (Pie Medical R-10) de 7.5 MHz y un mango (*handgrip*) de OPU de 60 cm de longitud. El mango se lubricó con gel y fue cubierto con una funda plástica sanitaria desechable. La punción se realizó con agujas desechables (Sterican, 18G 1.2x40 mm, B. Braun, Barcelona, España), que se ajustan en el extremo de la guía y van conectadas con una cánula a un tubo Falcon estéril de recogida de 50 mL. La aspiración se llevó a cabo mediante una bomba de vacío (Aspirator 3, Labotect, Göttingen, Alemania) accionada por pedal, con una presión de 70 mm Hg y un flujo continuo de 20 mL/min.

Cada 3-4 folículos aspirados fue necesario lavar la cánula que hace de guía entre la aguja y el tubo de recogida con solución salina tamponada

con fosfato (PBS, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, España) suplementado con heparina al 0,01% (Thermo Scientific Chemicals, España) y 1% de suero bovino fetal (SBF, Capricorn Scientific, España). Este medio se mantuvo durante todo el procedimiento en un baño termostático a 38°C. Cabe destacar que, con el propósito de proporcionar soporte analgésico y antiinflamatorio, tras la finalización de cada sesión de OPU, se administró a cada vaca vía i.m. 20 ml de ácido tolfenámico (Algenamic®, Fatro Ibérica, Barcelona, España)

5. Procesamiento y clasificación de los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs)

El líquido folicular aspirado se pasó a través de un filtro con un tamaño de poro de 50 µm para eliminar otras estructuras que hubieran sido recogidas, y así realizar sucesivos lavados para eliminar los restos de sangre con el medio de lavado utilizado para la cánula. Una vez aclarado el contenido, éste se pasó a una placa de Petri realizando un lavado con TCM199 (Sigma M2520, Sigma-Aldrich, España) suplementado con bicarbonato sódico (2.2 g/L, Sigma-Aldrich, España) y piruvato sódico (0.022 g/L, Sigma-Aldrich, España), y se procedió a aislar y realizar una primera observación de los CCOs. Para ello se empleó una lupa estereoscópica acoplada a una placa térmica a 38°C, y posteriormente, los CCOs así obtenidos se introdujeron en criotubos con ese mismo medio, para su traslado al laboratorio del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria en una incubadora portátil (Embryonentransp, Minitube, Tiefenbach, Alemania). Una vez clasificados, en función del grado del ovocito, se procedió a la maduración *in vitro* de los CCOs seleccionados.

6. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV) y vitrificación

Los CCOs seleccionados y que cumplían las características necesarias (Grados I, II y III) pasa-

ron a ser madurados *in vitro*. Para ello, se incubaron en gotas de 40 μL de medio de maduración (COW-IVM-LYO®, EmbryoCloud, Murcia, España), en grupos de un máximo de 10 ovocitos, cubiertos por aceite de parafina (NidOil, Nidacon, España). Posteriormente, las placas se introdujeron en incubador a 38.5°C y 5% CO_2 durante 22 h.

Completada la MIV, los ovocitos se vitrificaron, introduciéndose de forma sucesiva en diferentes soluciones hasta su conservación en nitrógeno líquido (N_2L). Así se consigue minimizar al máximo los posibles daños celulares por la formación de cristales de hielo, estrés oxidativo o endurecimiento de la zona pelúcida. Para la vitrificación se emplearon las siguientes soluciones:

- 1ª solución: TCM199 (*Tissue Culture Medium 199*) tamponado con HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico) + 10% SBF. Acondiciona al ovocito para exponerse a los crioprotectores, ya que el medio TCM199 es responsable de mantener el pH y equilibrio iónico; mientras que el SBF estabiliza la membrana celular aportando proteínas, protegiendo así el citoesqueleto.
- 2ª solución: 1ª solución + Etilenglicol (7.5%) + DMSO (7.5%). Es un acondicionamiento osmótico del ovocito. El DMSO, así como el etilenglicol, son agentes crioprotectores permeables, que ingresan al interior del ovocito para sustituir el agua intracelular y evitar así la formación de cristales de hielo que dañen la célula. En esta solución los ovocitos permanecen entre 10-15 min, hasta que recuperan su forma original.
- 3ª solución: 1ª solución + Sacarosa (0.5 M) + Etilenglicol (15%) + DMSO (15%). Constituye la etapa final de preparación del ovocito antes de la vitrificación, ya que incorpora concentraciones elevadas de crioprotectores permeables. Gracias a ello, el agua intracelular es reemplazada casi por completo, evitando la formación de cristales de hielo cuando el ovocito se

introduce en N_2L . Además, la sacarosa actúa como crioprotector no permeable, generando un gradiente osmótico que favorece la deshidratación controlada de la célula y la reducción de su volumen. En esta solución los ovocitos permanecen de 45 a 60 seg.

7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS 28.0.1.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Se compararon los datos de las variables experimentales para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (vacas 1 y 2). La normalidad y la homogeneidad de las varianzas se comprobaron mediante las pruebas de *Shapiro-Wilk* y *Levene*, respectivamente. Tras ambas pruebas, se aplicó una prueba *t* de *Student*. Cuando los datos no eran normales ni se cumplía homogeneidad de las varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Para la comparación de tres grupos independientes (2024 vs. 2025 vs. 2026), para la vaca 1, se utilizó ANOVA de un factor cuando se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En caso contrario, se empleó la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis*. Cuando la prueba global resultó significativa, se realizaron comparaciones post hoc (*Tukey*) para identificar entre qué grupos existían diferencias. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estimulación hormonal con FSHrb y complejo vitamínico AD₃E

Tras 4 sesiones de OPU por animal se obtuvieron un total de 94 ovocitos, de los cuales 81 (86.17%) correspondieron a la vaca 1 y 13 ovocitos (13.83%) a la 2. Del total de ovocitos obtenidos, 53 fueron viables (56.38%), correspondiendo 45 a la vaca 1 (84.90% sobre el total

de viables) y 8 a la vaca 2 (15.10% sobre el total de viables). La media $\pm$ desviación estándar (DS) del total de ovocitos recuperados por sesión de OPU de la vaca 1 fue de 20.25 ± 12.71 y para la vaca 2 de 3.25 ± 1.71 . A su vez, la media $\pm$ DS de ovocitos viables obtenidos por sesión de OPU de la vaca 1 fue 11.25 ± 12.69 y para la vaca 2 de 2.00 ± 1.41 . En la Tabla 3 se muestran los resultados de los ovocitos obtenidos por sesión de OPU en cada hembra donante y en la Tabla 4 los resultados de los ovocitos que fueron vitrificados para cada animal y sus porcentajes correspondientes.

Si tenemos en cuenta los ovocitos madurados *in vivo* obtenidos por OPU, el número total de ovocitos ascendió a 98. De los cuales, la vaca 1 aportó 3 ovocitos madurados *in vivo* (en la 2ª sesión de OPU) para un total de 84 ovocitos totales (85.71%), con una media de 21.25 ± 1.26 por OPU. La vaca 2 aportó 1 ovocito (en la 2ª sesión de OPU), para un total de 14 ovocitos totales (14.28%) con una media de 3.50 ± 0.58 por sesión/OPU.

Según los resultados presentados en la Tabla 5, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las categorías

Tabla 3. Ovocitos totales obtenidos por sesión de OPU y vaca donante.

Ovocitos/vaca	Vaca 1	Vaca 2	TOTAL
1ª OPU	34	1	35
2ª OPU	11	4	15
3ª OPU	28	5	33
4ª OPU	8	3	11
TOTAL	81	13	94

Tabla 4. Ovocitos vitrificados por hembra donante.

Ovocitos vitrificados/vaca	Vaca 1	Vaca 2	TOTAL
Nº ovocitos Totales	52	7	59
Media total + DS	13.00 ± 11.58	1.75 ± 2.06	14.75 ± 11.38
% sobre total ovocitos (94)	55.32	7.45	62.77
% sobre ovocitos vitrificados (59)	88.14	11.86	-

DS: Desviación estándar.

Tabla 5. Resultados de la calidad ovocitaria mediante estimulación ovárica con FSHrb+AD₃E en las vacas M-L del estudio.

Calidad ovocitos	Nº ovos total	Media total + DS	Nº ovos Vaca 1	Media $\pm$ DS Vaca 1	Nº ovos Vaca 2	Media $\pm$ DS Vaca 2	p valor Vaca 1 vs. Vaca 2
Grado I	12	3.00 ± 5.10	10	2.50 ± 5.00	2	0.50 ± 1.00	0.886
Grado II	21	5.25 ± 6.16	18	4.50 ± 6.14	3	0.75 ± 0.50	0.886
Grado III	20	5.00 ± 3.89	17	4.25 ± 3.77	3	0.75 ± 0.96	0.122
Grado IV	32	8.00 ± 5.40	29	7.25 ± 5.32	3	0.75 ± 0.96	0.053
DEG	5	1.25 ± 2.06	4	1.00 ± 2.00	1	0.25 ± 0.50	0.886
Total viables	53	13.25 ± 12.76	45	11.25 ± 12.69	8	2.00 ± 1.41	0.197
Total ovocitos	94	23.50 ± 12.83	81	20.25 ± 12.71	13	3.25 ± 1.71	0.038
Madurados <i>in vivo</i>	4	1.00 ± 0.71	3	0.75 ± 0.50	1	0.25 ± 0.50	0.343

Ovos: ovocitos. DEG: Degenerados. DS: Desviación estándar.

de calidad ovocitaria individual (Grados I, II y III, Madurados *in vivo* y Degenerados) entre las vacas 1 y 2, al presentar todas ellas un *p*-valor superior a 0.05. Esto indicaría que, a nivel de proporciones de calidad específica, ambos animales mantienen una respuesta comparable. No obstante, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el número total de ovocitos recuperados entre las vacas donantes (*p* = 0.038). La vaca 1 presentó una media de producción significativamente superior (20.25 ± 12.71) frente a la vaca 2 (3.25 ± 1.71), lo que demuestra una mayor respuesta a la FSHrb+AD₃E por parte de la vaca 1 en comparación con la 2, motivada muy probablemente, por la mayor edad de ésta última.

2. Estudio comparativo FSHp vs. FSHrb vs. FSHrb+AD₃E

Se han comparado los resultados obtenidos en nuestro estudio con 600 UI de FSHrb+AD₃E con los del trabajo de Metony et al. (2025) realizado en 2024, con estimulación mediante FSHp (Pluset®) y con el estudio de García-González et al. (2025) usando 800 UI de FSHrb. Todas estas experiencias se realizaron en el mismo animal (vaca 1) y los protocolos hormonales se administraron durante los mismos meses, pero

con un año de diferencia entre cada uno y pasando de realizar 1 sesión de OPU/semana en los años 2024 y 2025; a 2 sesiones de OPU/semana en 2026.

En la Tabla 6 observamos que, aunque estadísticamente no hay diferencias significativas entre tratamientos (*p* > 0.05), las variaciones numéricas son marcadas. El número total de ovocitos obtenidos con FSHp en 2024, fue de 37, con FSHrb en 2025, fueron 47 los ovocitos obtenidos y en 2026, con FSHrb+AD₃E, se obtuvieron 81 ovocitos. Este último resultado supone un incremento del 119% con respecto al primer tratamiento y con un mismo número de sesiones totales de OPU, variando únicamente la separación entre las mismas. El número de ovocitos Grado I pasó de 4 con FSHp a 10 con el uso de FSHrb+AD₃E. Finalmente, el número total de ovocitos viables varió de 24 en 2025 a 45 en 2026, con el uso de FSHrb+AD₃E, lo que supone un incremento del 87.50%.

DISCUSIÓN

En el análisis comparativo entre donantes, destaca la marcada superioridad productiva de la vaca 1 frente a la vaca 2, con una diferencia estadísticamente significativa en el número total de ovocitos recuperados por sesión ($20.25 \pm$

Tabla 6. Comparativa de calidad ovocitaria en la vaca 1 (años 2024-2025-2026): Evolución por tratamientos.

Calidad ovocitos	Nº ovos total 2024	FSHp (2024) Media ± DS	Nº ovos total 2025	FSHrb (2025) Media ± DS	Nº ovos total 2026	FSHrb+AD ₃ E (2026) Media ± DS	<i>p</i> -valor
Grado I	4	1.00 ± 0.82	5	1.25 ± 1.89	10	2.50 ± 5.00	0.761
Grado II	10	2.50 ± 1.91	12	3.00 ± 1.41	18	4.50 ± 6.14	0.366
Grado III	15	3.75 ± 0.50	7	1.75 ± 1.26	17	1.75 ± 1.26	0.134
Grado IV	4	1.00 ± 0.82	20	5.00 ± 0.82	29	7.25 ± 5.32	0.662
MAD <i>in vivo</i>	0	-	2	0.50 ± 0.58	3	0.75 ± 0.50	0.111
DEG	4	1.00 ± 1.41	1	0.25 ± 0.50	4	1.00 ± 2.00	0.745
Viables	29	7.25 ± 2.06	24	6.00 ± 2.00	45	11.25 ± 12.69	0.783
TOTAL	37	9.25 ± 3.10	47	11.75 ± 1.50	81	20.25 ± 12.71	0.303

Ovos: ovocitos. MAD *in vivo*: Madurados *in vivo*. DEG: Degenerados. DS: Desviación estándar

12.71 vs. 3.25 ± 1.71 ; $p = 0.038$). Esto refleja el impacto de la senescencia reproductiva en la vaca 2; que con sus 18 años de edad, presenta una respuesta mínima a la estimulación con FSHrb, lo que sugiere un agotamiento avanzado de su reserva folicular. Mientras que la vaca 1 todavía muestra una dinámica folicular activa capaz de superar la media de 18.06 ovocitos/OPU descrita por Builes-Higuaita (2025) para vacas de más de 10 años, la vaca 2 presenta un rendimiento residual de apenas 2.00 ± 1.41 ovocitos viables por sesión. Estos hallazgos confirman que, aunque el protocolo de FSHrb y vitamina AD₃E es altamente eficaz según lo reportado por Xiao et al. (2026), su éxito estaría condicionado por la edad de la donante. Asimismo, la tasa de viabilidad de los ovocitos obtenidos en nuestro estudio (56.38%) es comparable a la reportada por Morera-Jiménez et al. (2022) empleando FSHp (56.6%).

Atendiendo exclusivamente de los resultados obtenidos en la vaca 1 con respecto a años anteriores, no se han hallado diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los parámetros de calidad o producción analizados a través de las pruebas ANOVA y *Kruskal-Wallis*. Aunque los hallazgos registrados constatan que el protocolo de dosis única de FSHrb+AD₃E para la estimulación ovárica, desencadenó una estimulación folicular superior a los otros 2 tratamientos previos, obteniendo un total de 81 ovocitos. Así pues, la media de ovocitos totales recuperados por sesión/OPU se ha incrementado en más de un 100%, pasando de 9.25 ± 3.10 en 2024 a 20.25 ± 12.71 en 2026. La ausencia de significación estadística ante tal incremento se explica por la elevada variabilidad inter-sesión registrada en el último año (DS: 12.71 y varianza: 161.58), lo que indica una respuesta muy heterogénea entre las diferentes sesiones de OPU para la vaca 1 en 2026 (Tabla 3).

Cabe destacar que se obtuvieron 3 ovocitos madurados *in vivo* en la 2ª sesión de OPU, que según los criterios establecidos por Demetrio & Barfield (2021), se catalogaron como Grado IV,

pero por sus condiciones de calidad y viabilidad motivaron su vitrificación inmediata, sin paso previo por maduración *in vitro*. La presencia de estos ovocitos sugiere que la FSHrb posee una vida media más prolongada que la FSHp convencional. Esta hipótesis se ve respaldada por Gutiérrez et al. (2022), quienes observaron niveles plasmáticos elevados de esta hormona hasta el octavo día de tratamiento, lo que justifica fisiológicamente la viabilidad de realizar dos sesiones de OPU semanales con una única administración hormonal.

Este hallazgo es de especial interés para futuros estudios tras el abandono de la FSHp. Mientras que Metony et al. (2025) en 2024, no recuperaron ningún ovocito en Grado IV, tras la introducción de FSHrb en el estudio de García-González et al. (2025) y la posterior adición de un complejo vitamínico AD₃E (2026), se ha observado una presencia constante de los mismos. Este hecho podría estar relacionado con una mejor dinámica de maduración folicular inducida por la FSHrb junto con la suplementación vitamínica proporcionada de forma simultánea.

En cuanto a la calidad ovocitaria, es relevante destacar el impacto del protocolo de 2026 (FSHrb+AD₃E). Si bien los datos de ovocitos Grado I mantienen una estabilidad relativa, su número total se duplicó respecto al año inicial (10 vs. 4). No obstante, este aumento en la productividad total ha conllevado un incremento sustancial de los ovocitos Grado IV, cuya media ascendió de 1.00 en 2024 a 7.25 en 2026. La calidad ovocitaria se caracteriza por una marcada variabilidad individual, con una diferencia estadísticamente significativa en la producción total entre las donantes ($p = 0.038$), destacando la superioridad de la vaca 1. Este fenómeno sugiere que, aunque el uso de FSHrb+AD₃E es altamente eficaz en el reclutamiento de un mayor número de folículos, no todos ellos logran alcanzar un estadio de desarrollo óptimo posiblemente por realizar 2 sesiones de OPU/semana.

Una limitación importante de este estudio comparativo entre los 3 años y diferentes tra-

tamientos es que solo se ha realizado con un animal (vaca 1), lo que influye en el análisis estadístico de los resultados. Asimismo, al no evaluar la capacidad de desarrollo embrionario subsiguiente, no es posible relacionar la calidad ovocitaria con las tasas de éxito reproductivo final. Pese a estas consideraciones, el presente estudio proporciona evidencias iniciales sobre la efectividad de FSHrb combinada con AD₃E en tratamientos de estimulación ovárica en vacas de raza M-L. Resulta conveniente desarrollar investigaciones complementarias que abarquen un tamaño muestral más representativo, orientadas a cualificar el desarrollo embrionario y tasas de gestación para definir el potencial clínico de dicha hormona en programas reproductivos avanzados.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se confirma la viabilidad técnica de realizar 2 sesiones de OPU semanales (con un intervalo de 3 días) tras la administración de una única dosis de FSHrb. Este enfoque permite aprovechar la persistencia biológica de la hormona recombinante para maximizar el reclutamiento folicular sin necesidad de aplicaciones repetidas.

La suplementación con el complejo vitamínico AD₃E demostró una optimización en la calidad de los ovocitos, logrando duplicar el número total de ovocitos de Grado I (10 vs. 4 en 2024). Este resultado sugiere un efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por la estimulación hormonal exógena.

La edad de las donantes y la variabilidad individual son factores críticos en el éxito de la técnica. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.038$) en la producción total entre las donantes, donde la vaca 1 (15 años) mostró un rendimiento superior frente a la respuesta residual de la vaca 2 (18 años), la cual se encuentra condicionada por una senescencia reproductiva avanzada y el agotamiento de su reserva folicular.

El protocolo propuesto en 2026 (FSHrb+AD₃E y 2 OPU/semana) superó numéricamente el rendimiento de los datos anteriores de la raza. Con relación a la vaca 1 se registró un incremento del 119% en el total de ovocitos recuperados respecto al protocolo de FSHp de 2024 (81 vs. 37 ovocitos totales), consolidándose como la estrategia más eficiente para la obtención de ovocitos mediante OPU.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer la colaboración de AVAMUR al hacer posible la disponibilidad de las vacas de raza Murciano-Levantina y al personal de la GDV de la UMU por su disponibilidad y ayuda con el manejo de los animales. A D. *José Meroño (Fatro Ibérica, Delegación de Murcia)* por la donación de Algenamic®, Dalmaprost®, Dalmarelin® y Vetidina® AD₃E y a *Embryocloud* por la donación de los medios de MIV. Al Prof. D. *Francisco A. García-Vázquez* por el soporte técnico brindado en la evaluación estadística de los datos obtenidos en este estudio.

REFERENCIAS

1. Aparicio, G. (1960). *Zootecnia especial: etnología compendiada: descripción y estudio de razas nacionales y extranjeras*. Imprenta Moderna. Córdoba.
2. 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>
3. Bols, P.E.J. & Stout, T.A.E. (2018). Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. *Anim. Biotech.*, 1, 209-233. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10
4. Chandana, B., Allu, T., Katam, V.B., Manda, S., Hari Krishna, N.V.V., Ananda Rao K., Kona, S.S.R., Sandeep, G., Shanawaz,

- S.M. & Vara Prasad Reddy, L.S.S. (2026). Recombinant FSH (rFSH) superstimulation prior to ovum pick-up improved the rate of blastocyst production in zebu (*Bos Indicus*) cattle. *Indian J. Dairy Sci.*, 78(6), 574–579. <https://doi.org/10.33785/IJDS.2025.v78i06.011>
5. Boni, R., Roelofsen-Van Der Linden, M.W.A., Gielen, J.T., Van Der Weijden, G.C. & Kruip, T.A.M. (1999). Effects of frequency of ovum pick-up on oocyte yield and quality in dairy cows. *Theriogenology*, 51(1), 288. https://www.researchgate.net/publication/297517475_Ovum_pick-up_in_cattle_A_25_year_retrospective_analysis
 6. Builes-Higuaita, L.F. (2025). *Evaluación de la incidencia de variables como edad, raza, condición corporal y estado de preñez en la producción de ovocitos en bovinos*. <https://repository.unilasallista.edu.co/server/api/core/bitstreams/8ecba685-0879-4810-b393-6332e73e2f2b/content>
 7. Carvalho, J.B., Carvalho, N.A., Reis, E., Nichi, M., Souza, A.H. & Baruselli, P.S. (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69(2), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.035>
 8. 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).
 9. Elejalde, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Int.*, 18(6), 50–59. <https://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n6/revision1.pdf>
 10. García-González, E., Heras, S., Ramal, I. & Ruiz, S. (2025). Superestimulación ovárica, OPU y calidad ovocitaria en vacas de raza Murciano-Levantina. *An. Vet. Murcia*, 39, 1-15. <https://doi.org/10.6018/analesvet.683321>
 11. Gutiérrez, A.M., Palomares, R.A., Chaves, M.G. & Gnemmi, G. (2022). Pharmacokinetics and ovarian follicular response after a single injection of recombinant bovine follicle-stimulating hormone (FSHrb) in beef cows. *Theriogenology*, 189, 114–122. <https://doi.org/10.3390/ani12020153>
 12. Leroy, J.L., Vanholder, T., Delanghe, J.R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P.E., Dewulf, J. & de Kruif, A. (2004). Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, 62(6):1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.017>
 13. Merton, J.S., de Roos, A.P.W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L.A.M. & Dieleman, S.J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651–674. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01246-3)
 14. Metony, O., Heras, S., Ramal, I., Romero-Aguirregomezcorra, J. & Ruiz, S. (2025). Rendimiento de OPU en vacas de raza Murciano-Levantina: Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSHp (Pluset®). *An. Vet. Murcia*, 39, 1–15. <https://doi.org/10.6018/analesvet.631631>
 15. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2025). *Resultados de las encuestas de ganado bovino*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/>
 16. Morera-Jiménez, A., Velasco-García, E., Heras, S., Romero, J. & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (Folltropin®) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *An. Vet. Murcia*, 36, 1–17. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
 17. Pontes, J.H.F., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin,

- K.C.P. & Seneda, M.M. (2011). Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75(9), 1640–1646. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
18. Reader, K.L., Stanton, J.-A.L. & Juen- gel, J.L. (2017). The Role of Oocyte Or- ganelles in Determining Developmental Competence. *Biology*, 6(3), 35. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>
 19. Romero, J., De Souza, J., Sánchez, A., Poto, A., Astiz, S., & Ruiz, S. (2011). Resultados preliminares de un protocolo de estimula- ción con FSH (Pluset®) sobre el rendimiento de OPU en vacas secas de raza Holstein [Ponencia]. XVI Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina, Ávila, España.
 20. Ruiz, S. (2020). Ovum Pick-Up (OPU) in Cattle: An Update. In: J.C. Gardón & K. Sat- ué (Eds.), *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction: Current Trends and Practical Applications for Reproductive Manage- ment* (pp. 139–183). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780367817527>
 21. Saldarriaga, J.P., Cooper, D.A., Cartmill, J.A., Zuluaga, J.F., Stanko, R.L. & Wil- liams, G.L. (2007). Ovarian, hormonal, and reproductive events associated with synchronization of ovulation and timed appointment breeding of *Bos indicus*-in- fluenced cattle using intravaginal proges- terone, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F2alpha. *J. Anim. Sci.*, 85(1):151–162. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-335>
 22. Sarker, P.K., Rahman, M.M., Bhuiyan, M.U. & Shamsuddin, M. (2015). Effects of GnRH analogue and vitamin AD₃E on induction of cyclicity in anoestrus heifers. *BJVM*, 13(2), 21–29. <https://banglajol.info/index.php/BJVM/article/view/26618>
 23. Viana, J.H.M., Palhão, M.P., Siqueira, L.G.B., Fonseca, J.F. & Camargo, L.S.A. (2010). Ovarian follicular dynamics, folli- cle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up, *Theriogenology*, 73, 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>
 24. Xiao, J., Tian, M., Ding, Z., Mu, H., She, H., Li, H., Wang, B., Chen, H., Jia, Y., Wang, Y., Jin, Y. & Lin, P. (2026). Supple- mental vitamins A, D, and E improve OPU- IVP efficiency in postpartum dairy cows by alleviating oxidative stress. *Theriogenology*, 263, 118006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2026.118006>