

RENDIMIENTO DE OPU EN VACAS DE RAZA MURCIANO-LEVANTINA: RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA MEDIANTE FSHp (Pluset®)

OPU performance in Murciano-Levantina cows: response to ovarian stimulation using FSHp (Pluset®)

Metony, O.; Heras, S.; Ramal, I.; Romero-Aguirregomezcorta, J.; Ruiz, S.

Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

Autor de correspondencia: Salvador Ruiz, sruiz@um.es

Tipo de artículo: Originales

Recibido: 01/10/2024

Aceptado: 26/02/2025

RESUMEN

La técnica OPU (*Ovum Pick-Up*) permite obtener ovocitos de animales vivos para la fecundación (FIV) y producción *in vitro* de embriones (PIV). El objetivo del trabajo ha sido evaluar el rendimiento de la OPU en vacas de raza Murciano-Levantina (M-L), con el fin de recuperar ovocitos para la preservación de esta raza en peligro de extinción.

Se seleccionaron 2 vacas M-L, *Madroña* y *Unicornio*, de 13 y 6 años, respectivamente, que fueron sometidas a un protocolo de estimulación hormonal con FSHp (Pluset®) durante 4 semanas, con un total de 4 sesiones de OPU/animal. Los ovocitos recuperados fueron cuantificados y clasificados en 5 grados (I a IV y degenerados) según su calidad ovocitaria. Los ovocitos viables (grados I a III) fueron vitrificados o madurados *in vitro* para posterior FIV y PIV.

Se obtuvieron un total de 108 ovocitos, 34,26% de *Madroña* y 65,74% de *Unicornio*, de los cuales 92 (85,18%) fueron viables. El número medio de ovocitos totales ($p = 0,03$) y viables ($p = 0,02$) fue superior en *Unicornio* comparado con *Madroña*. Se obtuvieron significativamente más ovocitos grados I ($p = 0,04$) y III ($p = 0,03$) de *Unicornio* que de *Madroña*, y no se encontraron diferencias significativas para ovocitos grado

II, IV y degenerados. En *Madroña*, el mayor número de ovocitos obtenidos fue grado III, con diferencias significativas ($p = 0,03$) entre este grupo y ovocitos grado I, IV y degenerados. En *Unicornio*, el mayor número de ovocitos fue grado III, con diferencias significativas ($p = 0,02$; $p = 0,03$), entre éste y ovocitos grado IV y degenerados.

Este estudio demuestra que la OPU puede aplicarse con éxito en vacas M-L. Los resultados obtenidos muestran que existe variabilidad entre donantes en el número y calidad de ovocitos recuperados. Resultaría conveniente optimizar los protocolos de conservación genética en esta raza.

Palabras clave: vaca, raza Murciano-Levantina, ecografía, FSH, OPU, folículos, ovocitos.

ABSTRACT

The OPU (Ovum Pick-Up) technique makes it possible to obtain oocytes from live animals for fertilization (IVF) and *in vitro* embryo production (IVP). The aim of this study was to evaluate the performance of OPU in Murciano-Levantina (M-L) cows, to recover oocytes for the preservation of this endangered breed.

Two M-L cows, *Madroña* and *Unicornio*, aged 13 and 6 years, respectively, were selected and subjected to a hormonal stimulation protocol with FSHp (Pluset®) for 4 weeks, with a total of 4 OPU sessions/animal. The oocytes recovered were quantified and classified into 5 grades (I to IV and degenerated) according to their oocyte quality. Viable oocytes (grades I to III) were vitrified or matured *in vitro* for subsequent IVF and IVP.

A total of 108 oocytes were obtained, 34.26% from *Madroña* and 65.74% from *Unicornio*, of which 92 (85.18%) were viable. The mean number of total ($p = 0.03$) and viable ($p = 0.02$) oocytes was higher in *Unicornio* compared to *Madroña*. Significantly more grade I ($p = 0.04$) and III ($p = 0.03$) oocytes were obtained from *Unicornio* than from *Madroña*, and no significant differences were found for grade II, IV and degenerated oocytes. In *Madroña*, the highest number of oocytes obtained was grade III, with significant differences ($p = 0.03$) between this group and grade I, IV and degenerated oocytes. In *Unicornio*, the highest number of oocytes was grade III, with significant differences ($p = 0.02$; $p = 0.03$) between this group and grade IV and degenerated oocytes.

This study demonstrates that OPU can be successfully applied in M-L cows. The results obtained show that there is inter-donor variability in the number and quality of oocytes retrieved. It would be desirable to optimise genetic conservation protocols in this breed.

Keywords: cow, Murciano-Levantina breed, ultrasound, FSH, OPU, follicles, oocytes.

INTRODUCCIÓN

El sector bovino en España cuenta con un censo estable en torno a los 6,5 millones de cabezas, distribuidas en unas 140 mil explotaciones, lo que refleja la relevancia económica y social de este sector (MAPA, 2024). Dentro de este contexto, la raza bovina Murciano-Levantina (M-L), adaptada a las condiciones climáticas y geográficas de la Región de Murcia, se encuentra en peligro de extinción. La

preservación de esta raza autóctona es de vital importancia para mantener la biodiversidad ganadera y conservar un patrimonio genético único (Almela et al., 2011).

Hoy en día, la raza M-L cuenta con menos de 40 ejemplares, lo que la sitúa en una situación crítica según la Sociedad Española de Recursos Genéticos Animales (SERGA), siguiendo los criterios establecidos por la FAO (*Food and Agriculture Organization*). En la Tabla 1 se observa la evolución del número de cabezas de la raza

Tabla 1. Censo de la raza M-L en los 10 últimos años. ([Datos Censales (Murciana-Levantina)] - Ganadería - mapa.gob.es)

AÑO	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
HEMBRAS	27	32	16	14	14	24	28	18	32	32	30
MACHOS	5	5	6	9	5	6	6	4	19	19	9
TOTAL	32	37	22	23	19	30	34	22	51	51	39

bovina M-L en España durante los últimos 10 años (Datos Censales Murciana-Levantina).

Las instituciones oficiales han propuesto un programa de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas (R.D. 2129/2008) con el objetivo de lograr un centenar de ejemplares de la raza M-L, para sacarla del peligro extremo de extinción en el que se encuentra. El principal inconveniente radica en el alto grado de consanguinidad debido a su escasa población. Por esta razón, se ha sugerido implementar un programa que cruce la raza M-L con otra similar, con ascendencia común. Después de cuatro generaciones de retrocruce con semen de toro M-L, se pueden obtener animales con un porcentaje significativo de genes de la raza, lo que les permite integrarse en el registro del Libro Genealógico (Programa de Cría para la raza bovina M-L).

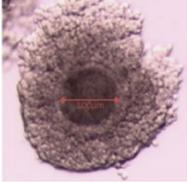
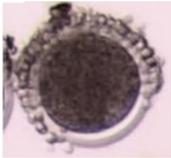
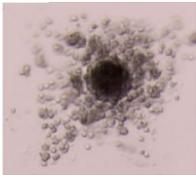
Actualmente, se combina la monta natural de sementales de la raza y la inseminación artificial (IA), pero esto no es suficiente para su mantenimiento. Por lo tanto, es crucial adoptar medidas de conservación *ex situ*, como la criopreservación de gametos y la producción *in vitro* (PIV) de embriones, para su posterior crioconservación o transferencia a receptoras bovinas de otras razas. El banco de germoplasma del Instituto Murciano de Investigaciones Agrarias y Agroalimentarias (IMIDA) es muy limitado y resulta urgente ampliar la actual reserva de gametos. Por esta razón, el empleo de técnicas de obtención de ovocitos directamente de hembras reproductoras vivas mediante punción folicular transvaginal ecoguiada (*Ovum Pick-Up*: OPU), sometidas previamente a estimulación hormonal, resulta de un gran interés.

Los ovocitos inmaduros así obtenidos serían sujetos a técnicas de reproducción asistida como son la maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (Ruiz & Poto, 2017).

Existen diversas clasificaciones de ovocitos bovinos obtenidos por OPU. En la clasificación de la *International Embryo Transfer Society* (IETS) (Demetrio & Barfield, 2021) los ovocitos son categorizados en cinco grados (grados I a IV y ovocitos degenerados), basados en el grado de expansión, número de capas de células del *cumulus* y en la granulación y color del ooplasma (Tabla 2). Esta clasificación permite determinar qué ovocitos se consideran aptos para la PIV. De tal forma, los ovocitos de los grados I, II y III son considerados aptos para ser madurados (MIV) y fecundados *in vitro* (FIV) para posteriormente cultivar *in vitro* los embriones resultantes. Sin embargo, los ovocitos de grado IV y degenerados no se emplean para la PIV, debido a que se consideran no viables.

La estimulación ovárica con la hormona folículo-estimulante (FSH) resulta ser eficaz en la mejora del rendimiento de la OPU, ya que según varios estudios, incrementa el número de ovocitos obtenidos (Chacón et al., 2004; Roover et al., 2008; Sendag et al., 2008). Se pueden realizar protocolos de OPU sin estimulación ovárica, sin embargo, el rendimiento sin estimulación hormonal, es decir, el número de complejos *cumulus*-ovocito (COCs, *cumulus-oocyte complexes*) viables obtenidos por sesión de OPU por animal es inferior a los obtenidos en vacas estimuladas con FSH (Ruiz et al., 2009).

Tabla 2. Clasificación de los complejos *cumulus*-ovocito (COCs) (Demetrio & Barfield, 2021).

Grado	Descripción	Imagen
I	<ul style="list-style-type: none"> Más de 3 capas compactas de células del <i>cumulus</i>. Ooplasma denso con granulación uniforme. 	
II	<ul style="list-style-type: none"> 1 ó 2 capas de células del <i>cumulus</i>. Ooplasma denso con granulación uniforme. Incluye ovocitos de grado I con ooplasma granulado. 	
III	<ul style="list-style-type: none"> Menos de 1 capa completa de células del <i>cumulus</i>. Incluye ovocitos de grado II con ooplasma granulado. 	
IV	<ul style="list-style-type: none"> Células del <i>cumulus</i> expandidas, a veces aglutinadas. Incluye ovocitos de grado III con ooplasma granulado. 	
Degenerado	<ul style="list-style-type: none"> Células del <i>cumulus</i> fusionadas. Ooplasma retraído o claro. 	

Cada protocolo presenta ventajas y desventajas (Roover et al., 2008; Ruiz et al., 2009; Romero et al., 2011). El protocolo de OPU sin estimulación hormonal tiene menor

coste y mantiene el ciclo ovárico natural. No obstante, posee un rendimiento inferior en la obtención de COCs por sesión de OPU y representa una mayor carga de trabajo. Por

otro lado, la OPU con estimulación hormonal permite una mejor sincronización del ciclo ovárico e incrementa el número de COCs obtenidos por sesión. En el presente trabajo, se ha utilizado un protocolo de estimulación hormonal con FSH de origen porcino (FSHp, *Pluset*®), que ha demostrado previamente su eficacia en el incremento de folículos ováricos aspirables por OPU para la obtención de ovocitos (Romero et al., 2011).

Además de la estimulación hormonal, el seguimiento ecográfico es crucial para monitorizar el crecimiento folicular y determinar el momento óptimo para la aspiración ovocitaria mediante OPU (Figura 1).

Los resultados obtenidos en la OPU se encuentran influidos por una gran cantidad de factores tanto técnicos como biológicos. A nivel técnico, debemos considerar el modelo de transductor o sonda ecográfica, las agujas de aspiración, la presión de vacío empleada y la habilidad del operador. Mientras que, a nivel biológico, se deben tener en cuenta factores tales como son la frecuencia de punción, el estado fisiológico y las variaciones debidas

al propio individuo: edad, raza y al grado de estimulación hormonal de la hembra donante (Ruiz, 2020).

El número de embriones bovinos transferibles producidos *in vitro* mediante OPU se ha visto incrementado un 14,35% a nivel mundial en el año 2023 con respecto a 2022 (1.862.504 vs 1.595.204). Por el contrario, se ha producido un descenso (6,33%), en el número de embriones transferibles obtenidos *in vivo* mediante protocolos de superovulación y transferencia de embriones (MOET) (371.138 vs 396.247) comparando estos mismos años (Viana, 2023; 2024), lo que demuestra la importancia de la técnica de OPU en los procesos de PIV en la especie bovina.

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en evaluar el rendimiento de la OPU en vacas de raza M-L, mediante la estimulación ovárica con FSHp (*Pluset*®). Utilizando técnicas avanzadas de reproducción asistida, como la OPU, se busca incrementar la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados para la posterior PIV de embriones de esta raza en peligro de extinción.

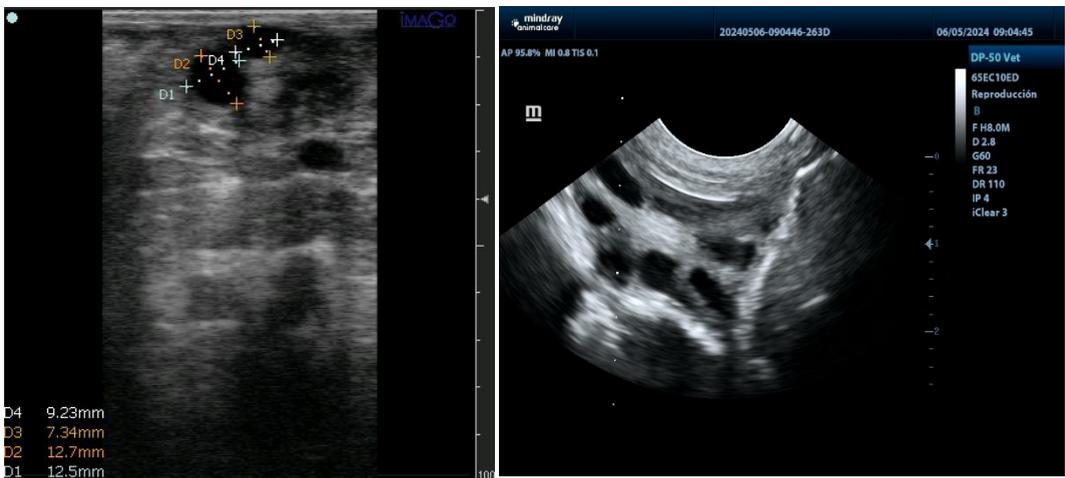


Figura 1. Ecografía de ovario bovino de folículos en crecimiento con sus medidas (izq.). Ecografía de ovario superovulado (dcha.) (Fuente: elaboración propia).

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo han seguido los requerimientos técnicos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia (UMU), con el código CEEA 827/2023.

1. Animales

El estudio se realizó con dos vacas de raza M-L, llamadas *Madroña* (Figura 2) y *Unicornio* (Figura 3), de 13 y 6 años de edad, respectivamente (Tabla 3). Ambas vacas fueron proporcionadas por la Asociación de Criadores de la Vaca Murciano-Levantina (AVAMUR) y alojadas en la Granja Docente Veterinaria (GDV) de la UMU. Los animales fueron sometidos a un protocolo de estimulación ovárica con FSHp (Pluset®) y a cuatro sesiones de OPU.

2. Diseño Experimental y Protocolo de Estimulación Hormonal

Antes de iniciar el protocolo, se realizaron evaluaciones ecográficas para determinar el estado de los ovarios y el momento del ciclo reproductivo de cada vaca (Figura 1). Se administraron 4 mL (0,075 mg/mL) via i.m. de PGF2 α (Dalmaprost®, Fatro Ibérica, Barcelona), una prostaglandina sintética de última generación a base de D-cloprostenol, con actividad luteolítica y uterotónica. La administración de PGF2 α se llevó a cabo sólo antes de la 1ª sesión de OPU. Dos días después, se administraron 2 mL (25 μ g/mL) de lecorelina i.m. (Dalmarelin®, Fatro Ibérica, Barcelona), un análogo de GnRH para inducir la ovulación.

La estimulación hormonal se llevó a cabo 36 h después de la inyección de GnRH, administrando 500 UI de FSHp (Pluset®, Calier, Barcelona) por vaca vía i.m., distribuidos en dosis decrecientes durante tres días consecutivos.



Figura 2. *Madroña* (Fuente: elaboración propia).



Figura 3. Unicornio (*Fuente: elaboración propia*).

Tabla 3. Datos de interés de las vacas M-L incluidas en el estudio.

Nombre	<i>Madroña</i>	<i>Unicornio</i>
Fecha nacimiento	10/04/2011	11/07/2018
Edad	13 años	6 años
Calificación morfológica	92 puntos	94 puntos
Número de partos	6-7	2

Las sesiones de OPU se realizaron todos los lunes durante cuatro semanas consecutivas, en el periodo comprendido entre el 6 y el 27 de mayo de 2024. El protocolo específico de estimulación hormonal fue el siguiente (Tabla 4):

- Día 1 (Viernes): Primera inyección de FSHp (3,5 mL, 175 UI de FSHp).
- Día 2 (Sábado): Segunda y tercera inyecciones (3 mL, 150 UI y 2 mL, 100 UI, respectivamente).
- Día 3 (Domingo): Cuarta inyección (1,5 mL, 75 UI).

3. Procedimiento de OPU

Para el desarrollo de la experiencia, los animales se llevaron a la sala de exploración de la nave de ganado bovino de la GDV, que cuenta con un potro de contención con medidas de seguridad adecuadas para limitar los movimientos excesivos del animal y evitar que interfieran y dificulten la manipulación y e interpretación de las imágenes ecográficas.

Previo al estudio ecográfico, se vació el recto de heces para conseguir mayor contacto

Tabla 4. Planificación semanal del protocolo de estimulación hormonal.

Día	Mañana (8:00 h)	Tarde (20:00 h)
Martes	PGF2 α Dalmaprost® (2 mL)	-
Jueves	GnRH Dalmarelin® (2 mL)	-
	PGF2 α Dalmaprost® (2 mL)	
Viernes	-	FSHp Pluset® (3,5 mL) 175 UI
Sábado	FSHp Pluset® (3 mL) 150 UI	FSHp Pluset® (2 mL) 100 UI
Domingo	FSHp Pluset® (1,5 mL) 75 UI	-
Lunes	OPU	

entre el transductor y la mucosa rectal y obtener una mejor imagen. Después, se realizó una palpación rectal del útero y la localización de los ovarios. Para las revisiones ecográficas, se empleó un ecógrafo portátil DP-50 Vet Mindray (Mindray, Shenzhen, China) equipado con una sonda lineal endorrectal (5–7,5 MHz). El seguimiento ecográfico se llevó a cabo el mismo día que se inició el protocolo hormonal, con el objetivo de evaluar el estado de los ovarios antes de comenzar el ciclo. El examen ecográfico comenzó siempre con el ovario derecho, procediéndose a observar y contabilizar los folículos en crecimiento, dominantes y la posible presencia de cuerpos lúteos (Figura 1).

Una vez en el potro de contención, se administraron a las hembras 0,90 mL (0,25 mL/100 kg p.v.) de xilazina vía i.m. (20 mg/mL; Xilagesic®, Calier, Barcelona). Posteriormente, se aplicaron 5 mL de lidocaína al 2% (Anesvet, Ovejero, León) por vía epidural. Además, para inducir analgesia y prevenir la respuesta inflamatoria, se administró ácido tolfenámico (Algenamic®, Fatro Ibérica, Barcelona) a una dosis de 25 mL/vaca (40 mg/mL) vía i.m. Una vez tranquilizado el animal, se procedió a vaciar el recto y limpiar la zona perineal y la vulva con agua tibia y jabón para iniciar la OPU.

En el procedimiento de OPU y para la visualización de los folículos ováricos, se empleó un ecógrafo FalcoVET (Esaote-Pie Medical

BV, Maastricht, Países Bajos) equipado con una sonda transvaginal (Pie Medical R-10) de 5–7,5 MHz, montada en un mango o “hand-grip” de 60 cm, donde se colocó la guía de punción. El mango se lubricó con gel y fue cubierto con una funda plástica sanitaria desechable. En la guía de punción se introdujo una aguja desechable Sterican (18G 1,2x40 mm, B. Braun, Barcelona), conectada a un tubo estéril de 50 mL mediante una cánula de teflón. Para realizar la aspiración, se utilizó una bomba de vacío (Aspirator 3, Labotect GmbH, Göttingen, Alemania), accionada con un pedal, conectada al tubo de recogida, que aplica una fuerza de succión constante de 70 mm 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.

4. Manipulación y Clasificación de Ovocitos

El contenido folicular se recogió en tubos Corning de 50 mL con solución salina tamponada con fosfato (PBS; *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich) suplementa-

da con heparina al 0,01% (Thermo Scientific Chemicals) y un 1% de suero fetal bovino (HI FBS, Capricorn Scientific), mantenido a 38°C en un baño termostático. Conforme se llenaban los tubos, se transportaron al laboratorio para la recuperación y clasificación de los COCs.

El líquido obtenido se pasó por un filtro de 50 µm y se realizaron varios lavados con la solución de PBS, con el fin de eliminar restos de sangre y otras células. Una vez lavado y filtrado, el líquido se trasladó a una placa de Petri para localizar los COCs bajo una lupa estereoscópica. Posteriormente, los COCs se lavaron en medio COW-WASH-LYO® (Embryocloud) y se transfirieron a criotubos con ese mismo medio para su transporte en incubador portátil (Embryonentransp, Minitube, Tiefenbach, Alemania) a otro laboratorio, donde se contabilizaron y clasificaron en cuanto al grado de calidad ovocitaria.

El número total (viables y no viables) y el grado de ovocitos recuperados se determinó para cada donante y sesión de OPU. Los ovocitos se clasificaron, según la IETS (Demetrio & Barfield, 2021; Tabla 2), como ovocitos viables (grados I, II y III) y no viables (grado IV y degenerados). Siendo uno de nuestros objetivos el aumentar la población de individuos de la raza M-L, se decidió madurar *in vitro* y fecundar *in vitro* con semen de toro M-L, una parte de los ovocitos viables obtenidos (n=30) y se vitrificaron para su crioconservación en NL₂ los ovocitos restantes (n=62).

5. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software PAST v4.17. Se aplicaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante pruebas *t* de Student o de Mann-Whitney según la distribución de los datos. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron mediante ANOVA seguido de pruebas

de Tukey. En todos los casos, se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En las cuatro sesiones de OPU realizadas se obtuvieron un total de 108 ovocitos, de los cuales 92 de ellos (85,18%) fueron viables (grados I, II y III). El número medio de ovocitos totales recuperados por sesión de OPU fue de $13,50 \pm 6,72$, observándose una diferencia significativa entre las dos vacas (Tabla 5). El número medio de ovocitos totales recuperados de *Unicornio* ($17,75 \pm 6,90$) fue significativamente superior ($p = 0,03$) al obtenido de *Madroña* ($9,25 \pm 3,10$) (Tabla 5). Del mismo modo, el número medio de ovocitos viables de *Unicornio* ($15,75 \pm 7,80$) fue superior ($p = 0,02$) al de *Madroña* ($7,25 \pm 2,06$) (Tabla 5).

En *Unicornio* se observó una tendencia a la disminución en el número de ovocitos recuperados después de la primera sesión de OPU, que posteriormente, se mantuvo estable en las sesiones siguientes (Figura 4). En *Madroña*, excepto en la 2ª sesión en la que se produjo un descenso del número de ovocitos, el número de ovocitos totales recuperados fue estable en el resto de sesiones de OPU (Figura 4).

Con respecto a la calidad ovocitaria, se obtuvo un mayor número ($p = 0,04$ y $p = 0,03$, respectivamente) de ovocitos grado I y grado III de *Unicornio* que de *Madroña*. No se encontraron diferencias significativas entre las vacas para los ovocitos de grados II, IV y degenerados (Tabla 5).

Además, se comparó la calidad de los ovocitos obtenidos de una misma vaca en el total de las sesiones de OPU. En *Madroña*, el número de ovocitos obtenidos de grado III, fue significativamente superior ($p = 0,03$) a los de grado I, IV y degenerados, no observándose diferencias significativas entre el número de ovocitos de grados II y III. En cuanto a *Unicornio*, el mayor número de ovocitos obtenidos fue también de grado III, observándose diferencias significativas con ovocitos de grado IV ($p = 0,02$) y degenerados ($p = 0,03$).

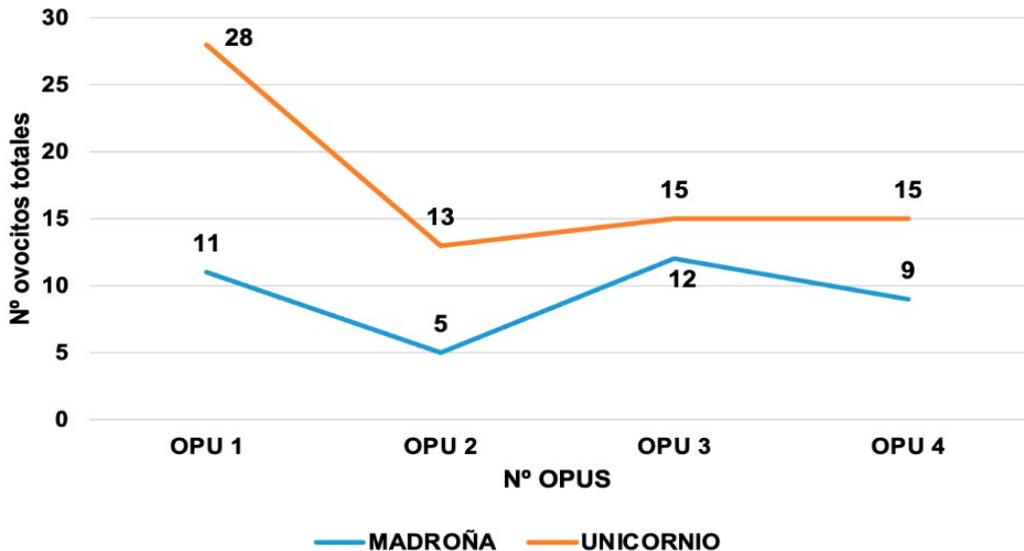
Tabla 5. Número de ovocitos recuperados en las sesiones de OPU clasificados según el grado de calidad ovocitaria.

Calidad ovocitaria	VACAS				p valor	TOTAL
	MADROÑA		UNICORNIO			
	Nº ovocitos	Media ± SD	Nº ovocitos	Media ± SD		
Grado I	4 ^a	1,00 ± 0,82*	14 ^{ab}	3,50 ± 1,73*	0,04	18
Grado II	10 ^{ab}	2,50 ± 1,91	21 ^{ab}	5,25 ± 4,72	0,32	31
Grado III	15 ^b	3,75 ± 0,50*	28 ^a	7,00 ± 1,82*	0,03	43
Grado IV	4 ^a	1,00 ± 0,82	3 ^b	0,75 ± 0,96	0,70	7
Degenerados	4 ^a	1,00 ± 1,41	5 ^b	1,25 ± 1,89	0,86	9
Ovocitos totales	37	9,25 ± 3,09*	71	17,75 ± 6,90*	0,03	108
Ovocitos viables	29	7,25 ± 2,06*	63	15,75 ± 7,80*	0,02	92

La media ± desviación estándar (SD) refiere el número medio de ovocitos recuperados por cada sesión de OPU.

*: indica diferencias significativas entre las vacas dentro de las mismas calidades ovocitarias y en los ovocitos totales y viables ($p < 0,05$).

^{a,b}: distintos superíndices indican diferencias significativas entre las distintas calidades ovocitarias dentro de la misma vaca ($p < 0,05$).

**Figura 4.** Evolución del número de ovocitos totales por vaca y sesión de OPU.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha comparado el número y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU en dos vacas de la raza M-L. En relación con el número de ovocitos totales recuperados, la media conjunta de nuestras dos vacas fue de $13,50 \pm 6,72$ ovocitos por sesión de OPU. Estos resultados fueron similares a otro estudio en vacas M-L con protocolo de estimulación hormonal en el que obtuvo una media de ovocitos totales de $10,70 \pm 2,30$ (Romero et al., 2012). Nuestros resultados también son comparables con otros estudios que utilizaron estimulación hormonal en diferentes razas de *B. taurus*, con valores que fluctuaron entre $8,20 \pm 1,20$ y $11,80 \pm 8,20$ (Chaubal et al., 2006; Roover et al., 2008; Romero et al., 2011; Morera-Jiménez et al., 2022). Sin embargo, si analizamos nuestros resultados individualmente para cada donante, el número medio de ovocitos recuperados por sesión de OPU en *Unicornio* resultó bastante superior ($17,75 \pm 6,90$) a las medias obtenidas por los autores mencionados anteriormente; mientras que de *Madroña* ($9,25 \pm 3,09$) se obtuvieron resultados similares.

Tanto la especie donante (*Bos taurus* o *Bos indicus*) como la raza dentro de la misma especie influyen en el proceso de obtención de ovocitos. Las vacas de la especie *B. indicus* tienden a tener ondas foliculares más numerosas y un mayor número de folículos más pequeños en comparación con las vacas *B. taurus* (Ruiz, 2020).

Además de la especie, factores tales como son las variaciones individuales, los tratamientos hormonales y la edad pueden influir en el número de ovocitos obtenidos (Ruiz, 2020). Respecto a las variaciones individuales, se ha observado que la concentración de hormona antimülleriana (AMH) podría influir en la población folicular y, por lo tanto, en el número de ovocitos ováricos (Vernunft et al., 2015). No obstante, esta relación todavía no está muy clara y se deben realizar más estudios. Vernunft

et al. (2015) categorizaron las vacas de raza Holstein, en grupos de buenas o malas donantes de ovocitos de OPU, en relación con los niveles de AMH en el plasma. En este estudio, en las vacas con un nivel bajo ($\leq 0,236$ ng/mL) de AMH se obtuvieron menos ovocitos en comparación con las vacas con nivel alto ($\geq 0,410$ ng/mL) de AMH ($5,70 \pm 0,50$ vs $8,20 \pm 0,80$, respectivamente) (Vernunft et al., 2015). Considerando la diferencia en el número de ovocitos obtenidos de nuestras vacas, sería relevante medir los niveles de AMH para ver si su concentración está relacionada con los resultados de nuestro estudio.

En cuanto al efecto de los tratamientos hormonales, varios investigadores han concluido que la estimulación con gonadotropinas en los protocolos de OPU tiene efectos positivos en comparación con animales que no son sometidos a estimulación hormonal (Goodhand et al., 2000; Roover et al., 2008; Sendag et al., 2008; Aller et al., 2010). Dependiendo de los estudios, se ha comprobado que podría aumentar la población folicular, el número de ovocitos recuperados y mejorar la calidad de los ovocitos obtenidos (Sendag et al., 2008; Aller et al., 2010).

Se han realizado diferentes estudios acerca de la calidad de los ovocitos obtenidos mediante OPU con tratamiento de FSH (Sendag et al., 2008; Aller et al., 2010; Giraldo & Ordoñez, 2017; Morera-Jiménez et al., 2022). No obstante, algunos de ellos no utilizan el mismo protocolo de estimulación hormonal o la misma clasificación que hemos seguido en nuestro trabajo. Giraldo & Ordoñez (2017) compararon la calidad de los COCs obtenidos por OPU con un protocolo de estimulación utilizando solamente FSH, con otro combinando FSH y hCG, con el que obtuvieron una mayor calidad ovocitaria (grados I + II) comparado con el tratamiento solo de FSH, con el que no obtuvieron ningún ovocito de grado I. Al igual que en el protocolo de FSH del estudio de Giraldo & Ordoñez (2017), en nuestro estudio, el mayor porcentaje de ovocitos viables

fue de grado III. Sin embargo, en nuestro estudio un 16,67% de los ovocitos viables fue de grado I. Por otra parte, Morera-Jiménez et al. (2022) compararon la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU, antes y después de un protocolo de estimulación hormonal con GnRH y FSH (Folltropin®). Morera-Jiménez et al. (2022) obtuvieron un mayor número de ovocitos viables de buena calidad con el protocolo con estimulación hormonal con respecto al protocolo sin estimulación. En nuestro estudio, obtuvimos en total menos ovocitos de grado I (16,67% vs 27,71%) y un mayor número de ovocitos de grado III (39,81% vs 19,28%) que en el trabajo referido de Morera-Jiménez et al. (2022).

Estudios como el de Malhi et al. (2005) establecen que la reserva ovárica en modelos bovinos disminuye con la edad avanzada (entre 13 y 14 años) y esta reducción se traduce en un menor número de ovocitos recuperables. Por lo tanto, las vacas de mayor edad tienen una capacidad disminuida para producir ovocitos viables. Del mismo modo, Reis et al. (2006) concluyeron que el número de COCs producidos y su calidad eran directamente proporcionales a la edad de las vacas. En este estudio, obtuvieron de vacas Holstein sacrificadas en matadero, un número medio de $7,73 \pm 1,75$ ovocitos para vacas de entre 5 y 6 años, $10,54 \pm 1,72$ para vacas de entre 7 y 8 años, y $11,55 \pm 1,52$ para las vacas de más de 8 años (Reis et al., 2006). Este aumento en el número de ovocitos obtenidos con la edad, lo atribuyeron a la relación directa entre la edad de las vacas y el tamaño de sus ovarios (Reis et al., 2006).

En nuestro estudio, la diferencia en el número de ovocitos recuperados en las dos vacas donantes podría explicarse, en parte, por la edad de las mismas. Estudios previos han demostrado que la capacidad ovárica en vacas alcanza su punto máximo alrededor de los 9 años, disminuyendo progresivamente a partir de entonces (Hasler et al., 1981). En este sentido, el menor número de ovocitos obtenidos

de *Madroña*, que tiene 13 años, podría estar relacionado con una reducción fisiológica de la reserva folicular debido a su mayor edad (Malhi et al., 2005). Por otro lado, podríamos pensar que *Unicornio* es una vaca de alta capacidad reproductiva, en relación al número y calidad de ovocitos obtenidos, teniendo en cuenta que tiene 6 años y de acuerdo a la literatura, aún no ha llegado a su punto máximo de producción ovocitaria.

Una de las principales limitaciones del estudio es el reducido número de donantes incluidos, ya que se trabajó únicamente con dos vacas de raza M-L. Esta limitación se debe a la situación crítica de la raza, que cuenta con menos de 40 ejemplares censados en la actualidad, distribuidos en diferentes explotaciones ganaderas. La disponibilidad de donantes fue un factor determinante en el diseño del estudio, lo que dificultó la posibilidad de ampliar la muestra.

Sin embargo, este trabajo representa un importante paso en la aplicación de técnicas avanzadas de reproducción asistida en esta raza autóctona. Los resultados obtenidos ofrecen información valiosa para el desarrollo de futuros protocolos de conservación genética. Para obtener conclusiones más robustas y generalizables, sería recomendable llevar a cabo estudios adicionales con un mayor número de donantes, siempre que la situación de la raza lo permita.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se ha demostrado que el uso de la OPU junto con la estimulación hormonal mediante FSHp (Pluset®) permite recuperar ovocitos viables de vacas de raza M-L, contribuyendo a los programas de preservación genética de esta raza en peligro de extinción.

Los resultados obtenidos confirman la eficacia del protocolo de estimulación hormonal para incrementar la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados. Se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos ob-

tenidos entre las dos vacas donantes, posiblemente influenciadas por factores individuales y la edad de los animales. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de muestra, no es posible determinar, de forma concluyente, si estas diferencias son debidas a la edad de los animales o bien a otros factores. De cualquier forma, estos hallazgos son relevantes para optimizar los protocolos de recuperación ovocitaria en razas autóctonas y pueden ser utilizados como base para futuros estudios enfocados en mejorar la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida en bovinos.

El presente trabajo representa un importante paso hacia la implementación de programas más amplios de preservación de la raza M-L mediante técnicas avanzadas de reproducción. Se recomienda continuar con investigaciones adicionales para evaluar el impacto de otros protocolos hormonales y analizar cómo la variabilidad genética afecta la respuesta a la estimulación ovárica. De esta forma, consideramos que los resultados obtenidos en este estudio pueden contribuir a la preservación y recuperación de razas autóctonas en peligro de extinción, ayudando a mantener la biodiversidad del ganado bovino en España.

AGRADECIMIENTOS

A *AVAMUR* por la donación de las vacas de raza M-L y al personal de la GDV de la UMU por su ayuda en la manipulación de las mismas. A Fatro Ibérica (Delegación de Murcia) por la donación de Dalmarelin®, Dalmaprost® y Algenamic® y al ICOVRM (Colegio de Veterinarios de Murcia) por la donación de Pluset®. Al Prof. D. Francisco A. García-Vázquez por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

REFERENCIAS

1. Aller, J. F., Mucci, N. C., Kaiser, G. G., Ríos, G., Callejas, S. S., & Alberio, R. H. (2010). Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 119(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.11.009>
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. Chacón, L., Martínez, W., Valbuena, D., Peña, M. A., & Bernal, S. M. (2004). Efecto de la estimulación hormonal en vacas girholando sobre el número de folículos, recolección de oocitos y producción de embriones in vitro. *Repositorio Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA)*. <https://repository.udca.edu.co/entities/publication/undefined>
4. Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Riesen, J. W. X., Tian, X., & Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65, 1631–1648. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
5. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2024). Datos censales de la raza Murciano-Levantina. Recuperado de <https://servicio.mapa.gob.es/arca>
6. Demetrio, D. G. B., Benedetti, E., Demetrio, C. G. B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A., & Dos Santos, R. M. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? *Animal Reproduction*, 17(3), e20200053. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>
7. Demetrio, D. G. B., & Barfield, J. (2021). Appendix 2: Photographic illustrations of bovine cumulus oocyte complexes. En *Manual of the International Embryo Technology Society* (5th ed., pp. 1–7).
8. Giraldo, J. J., & Ordoñez, S. (2017). Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad

- de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Journal of Agriculture and Animal Science*, 6(1), 20–28. <https://doi.org/10.22507/jals.v6n1a2>
9. Goodhand, K. L., Staines, M. E., Hutchinson, J. S., & Broadbent, P. J. (2000). In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Animal Reproduction Science*, 63(3–4), 145–158. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00186-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00186-x)
 10. Hasler, J. F., Brooke, G. P., & McCauley, A. D. (1981). The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15(1), 109. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80026-X)
 11. Malhi, P. S., Adams, G. P., & Singh, J. (2005). Bovine model for the study of reproductive aging in women: Follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction*, 73(1), 45–53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038745>
 12. 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>
 13. Programa de Cría para la raza bovina Murciano-Levantina. (n.d.). https://www.mapa.gob.es/gl/ganaderia/temas/zootecnia/programadecriadef_tcm37-664643.pdf. Último acceso: 11/03/2025.
 14. Reis, A., Metelo, R., Santos, P., & Silva, F. M. da. (2006). Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(5), 5. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26571>
 15. Romero, J., De Souza, J., Sánchez, A., Poto, A., Astiz, S., & Ruiz, S. (2011). Resultados preliminares de un protocolo de estimulación con FSH (Pluset®) sobre el rendimiento de OPU en vacas secas de raza Holstein. *XVI Congreso Internacional ANEMBE*, 340–342. Ávila, España.
 16. Romero, J., Astiz, S., Almela, L., Peinado, B., Poto, A., & Ruiz, S. (2012). FSH (Pluset®) stimulation protocol followed by ovum pick-up on the Murciano-Levantina breed recovery program. *XXVII World Buaitrics Congress*, 190. Lisboa, Portugal.
 17. Roover, R., Feugang, J., Bols, P., Genicot, G., & Hanzen, C. (2008). Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
 18. Ruiz, S., Zaraza, J., Sánchez, A., & Rath, D. (2009). Rendimiento de la OPU en vacas secas no estimuladas para el uso de ovocitos en la producción in vitro de embriones. *ITEA*, 681–683.
 19. Ruiz, S. (2014). OPU (Ovum Pick-Up) en bovinos. *Mundo Ganadero*, 261, 14–22.
 20. Ruiz, S., & Poto, A. (2017). La raza bovina Murciano-Levantina: Presente y futuro. *Boletín Foro Agro Ganadero*.
 21. Ruiz, S. (2020). Ovum Pick-Up (OPU) in cattle: An update. En *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction* (pp. 139–183). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780367817527-7>
 22. Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Haderler, K.-G., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 106(1–2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.007>

23. Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Diederich, M., & Kuwer, A. (2015). Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. *Journal of Reproduction and Development*, 61(1), 74–79. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-091>
24. Viana, J.H.M. (2023). 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 41(4), 1–25.
25. Viana, J.H.M. (2024). 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 42(4), 1–15.