



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA JALEA REAL DE ABEJA (*APIS MELLIFERA*),
IMPREGNADA EN ESPONJAS DE POLIURETANO, SOBRE LAS POBLACIONES
CELULARES Y LA MICROBIOTA VAGINAL DE CABRAS DOMÉSTICAS (*CAPRA
HIRCUS*)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
REYNALDO BAZALDÚA VITAL**

Asesores: José Luis Cerbón Gutiérrez
Lucía Eliana Rangel Porta
Laura Cobos Marín

Dedicatorias

A Valentina, mi rayito de Sol. Nunca dejes de cuestionar el *porqué*.

Agradecimientos

Sin el apoyo intelectual, material o emocional de las personas e instituciones mencionadas en esta sección, este trabajo no podría ser.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, institución que me formó como profesionalista, me llenó de amigos, de abrazos, y de humanidad.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM que, además de formarme como Médico Veterinario Zootecnista, me transformó en docente y me enseñó a hacer investigación.

A los departamentos de Reproducción y de Microbiología e Inmunología, que me brindaron un sinfín de oportunidades como ayudante de profesor, servicio social y tesista.

Al Centro de Enseñanza Producción Investigación en Producción y Salud Animal, por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Cerbón y a la Dra. Lucy, por permitirme concretar mi gusto por la endocrinología y la reproducción al aceptarme como tesista, y guiarme tan acertadamente en este trabajo.

A la Dra. Cobos, por enseñarle a un *reproductólogo* a profundidad la inmunología, y por guiar este trabajo con tanto entusiasmo.

A la Dra. María Antonieta Mójica Sánchez se le agradece el apoyo técnico para la realización de esta tesis, por guiarme en el proceso de diagnóstico bacteriano.

Al Dr. Balcázar, quién inspiró esta línea de investigación y nos la concedió; y financió la JR y el agar nutritivo.

A Marion Galindo Castañeda y al Dr. Carlos Gutiérrez, por sus aportaciones en el proceso estadístico.

A Melbi Ramos y al Dr. Óscar Rico, que me enseñaron a usar R.

A Isabel Muñoz, quién me enseñó quién era cada célula en las citologías.

A Pablo Escorcía Ortiz y a Diana Velázquez, por apoyarnos a Chepo y a mí en el proceso de muestreo.

A la Dra. Anita, por sus incontables aportaciones durante todo este camino

Al Dr. Eduardo Cabrera, por la asesoría y apoyo recibidos de parte suya.

A la Dra. Carmen Frías y a la Dra. Maricela; por escucharme y apoyarme siempre; sobretodo por iniciarme y formarme como docente.

A todos los animales que me acompañaron en mi proceso formativo como médico veterinario, y en especial a las cabras.

A Karen que, cuando las muestras eran muchas, me ayudó a sembrar.

A todo el equipo inmunólogo que me echó porras durante todo este trabajo: Marion, Isa, Erik, Hugo, Danny, Yolo, Karen, Ajitzi, Laurita y July.

A mis amigos *reproductólogos*: Fer, Dafne, Quique, Héctor y Daniela.

A mi jurado, por su tiempo para revisar este trabajo.

A mis abuelos Ana y Victor, por llenar a su nieto de amor y bondad.

A Gio, Rox, Kary, Viry, Andy, Ceci, Charlie, Juanito, Gaby, Memito, Ana Pa, Sebastián, Cris, Pamela y Diana, por llenarme de aventuras.

A Norma, Carmen, Silvina, Silvia, Juan, Memo, Pedro, Paty, Lulú y Titis.

Al sabio que tengo más cerca: mi hermano Victor.

A Fofa y a Arturo, mis personas favoritas.

A Victor y a Rosalinda, mis padres, a quienes les debo todo lo que soy.

Y, por supuesto, a Vale.

CONTENIDO

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
	i.	Manejo reproductivo de la cabra 3
	ii.	Esponjas intravaginales y vaginitis 5
	iii.	Jalea Real 7
III.	Hipótesis	9
IV.	Objetivos	9
V.	Materiales y métodos	10
	i.	Lugar de realización 10
	ii.	Animales y tratamientos 10
	iii.	Preparación de las esponjas 10
	iv.	Aplicación de las esponjas 11
	v.	Toma de muestras 12
	vi.	Conteo e identificación de bacterias 12
	vii.	Interpretación de las CVE 13
	viii.	Análisis estadístico 14
VI.	Resultados	14
	i.	Exudados vaginales y Citologías Vaginales exfoliativas 14
	ii.	Unidades formadoras de colonias y aislamientos bacterianos 16
VII.	Discusión	20
VIII.	Conclusiones	25
IX.	Anexos	27

X. Referencias	37
----------------	----

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.- Grado de inflamación en el epitelio vaginal de las hembras tratadas con esponjas impregnadas con Cronolona (Cr), sin principio activo (PUAD) y con Jalea Real (JR), al día del retiro del dispositivo.	16
Figura 1.- Rango del conteo de bacterias, expresado como Unidades Formadoras de Colonias/ ml, antes (D0) y después (D9) de los tratamientos, en las cabras de los grupos Cr (cronolona), JR (Jalea Real y PUAD (Poliuretano de Alta Densidad sin principio activo).	18
Figura 2.- Presencia de los géneros bacterianos y el número de UFC/ml en los individuos experimentales, antes (D0) y después (D9) del tratamiento en las cabras de los grupos Cr (cronolona), JR (Jalea Real) y PUAD (Poliuretano de Alta Densidad sin principio activo).	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Poblaciones celulares obtenidas en la CVE de cabras antes del tratamiento de inducción del estro (Día 0).	27
Anexo 2.- Poblaciones celulares obtenidas en la CVE de cabras después del tratamiento de inducción del estro (Día 9).	29
Anexo 3.- UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras de los grupos Cr, PUAD y JR antes y después del tratamiento de inducción del estro.	31

I. Resumen

BAZALDÚA VITAL REYNALDO. Evaluación del efecto de la jalea real de abeja (*Apis mellifera*), impregnada en esponjas de poliuretano, sobre las poblaciones celulares y la microbiota vaginal de cabras domésticas (*Capra hircus*). Bajo la dirección del MPA. José Luis Cerbón Gutiérrez, de la Dra. Lucía Rangel Porta y de la Dra. Laura Cobos Marín.

Numerosos trabajos han demostrado que el tratamiento con esponjas intravaginales (EIV), comúnmente utilizadas para la inducción o sincronización del estro en pequeños rumiantes, incrementa las concentraciones bacterianas en la vagina al final del tratamiento. Por otro lado, se ha reportado que la Jalea Real (JR) posee propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, además, en un estudio reciente se demostró la capacidad de la JR para sincronizar el ciclo estral en cabras cuando se aplica en EIV. El presente estudio fue realizado con el fin de evaluar las propiedades antimicrobiana y antiinflamatoria de la JR, impregnada en EIV colocadas durante 9 días en cabras de 4 a 7 años, en anestro. Para lo anterior, se utilizaron 3 grupos con 6 individuos cada uno. Para comprobar el incremento en la carga bacteriana de la vagina por el uso de las esponjas se incluyeron 2 grupos: Grupo cronolona (grupo Cr), y grupo de esponjas de poliuretano de alta densidad sin principio activo (grupo PUAD). En un tercer grupo se emplearon esponjas de poliuretano impregnadas con 12 g de JR (grupo JR). La actividad antimicrobiana de la JR fue evaluada mediante la identificación de bacterias aerobias y el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), a partir de cultivos de hisopados vaginales. El grado de inflamación

fue evaluado mediante Citologías Vaginales Exfoliativas, así como con la presencia de hemorragia en el exudado vaginal postratamiento. Las UFC se incrementaron en todos los grupos al término del tratamiento. No se encontraron diferencias en el número de UFC entre grupos ($P > 0.05$), ni en los aislamientos bacterianos al final del tratamiento ($P > 0.05$). Tampoco hubo diferencias en la presencia de hemorragia en el exudado ($P > 0.05$), ni en el grado de inflamación ($P > 0.05$). Se concluye que la JR aplicada en EIV no disminuye la proliferación bacteriana, ni la inflamación observadas al final del tratamiento.

II. Introducción

i. Manejo reproductivo de la cabra

La actividad reproductiva de las cabras (*Capra hircus*) muestra un patrón de estacionalidad relacionado con las variaciones anuales del fotoperiodo, presentándose principalmente en los meses de menor luminosidad. Sin embargo, el inicio y la duración del periodo reproductivo también dependen de otros factores, tanto fisiológicos como ambientales (como clima, disponibilidad de alimento, raza y sistema de producción). La estacionalidad reproductiva, caracterizada por épocas sucesivas de reproducción y anestro alternadas, se acentúa conforme más alejadas del ecuador se encuentren las cabras (Fatet *et al.*, 2011; Simões, 2015). Es así que, en países templados, la época de apareamiento ocurre durante el otoño e invierno (Chemineau *et al.*, 2004), y la mayoría de los partos (o el inicio del anestro) se presentan en la primavera (Chemineau *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2006).

Además de la estacionalidad, las demandas del mercado de carne y leche a lo largo del año, dictan los manejos reproductivos y productivos de los hatos caprinos, que pueden implicar distintos enfoques entre regiones de diferentes latitudes, e incluso entre razas (Simões, 2015). Para ampliar los periodos de producción o mantenerlos durante todo el año, es necesario recurrir a manejos para manipular el ciclo estral, entre los cuales se encuentran las administraciones hormonales para la inducción del estro en la época de anestro, o para sincronizarlo en las hembras que se encuentran en la época reproductiva.

La inducción del estro tiene como finalidad la presentación de actividad reproductiva de la hembra durante la época de anestro. Esto puede lograrse mediante la

administración de progesterona (P4) o de sus análogos, partiendo del principio de que estas hormonas reducen la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los estrógenos, ocasionada entre otros factores, por el fotoperiodo. Esto permite que, al retirarse los progestágenos, se establezca un patrón de secreción pulsátil de LH que favorece la maduración folicular, con lo que se produce una cantidad suficiente de estrógenos para retroalimentar positivamente la secreción de LH, hasta provocar su pico preovulatorio, que ocasiona la ovulación (Valencia, 2018; Zarco, 2018). Otros métodos de inducción del estro consisten en la administración de melatonina, el fotoperiodo artificial, el efecto macho, o la administración de otros tratamientos hormonales, como GnRH, y gonadotropinas (Pietroski *et al.*, 2013; Zarco, 2018).

Por su parte, la sincronización del estro tiene la finalidad de que un conjunto de hembras sea receptivo a la monta en un tiempo predeterminado, minimizando tanto los costos de producción como los errores en la detección de calores, para lo cual puede manipularse la fase lútea o la fase folicular del ciclo estral. La fase lútea puede extenderse al administrar una fuente exógena de P4 o de sus análogos, los cuales impiden la maduración final de los folículos del ovario y la ovulación, pues retroalimentan negativamente la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la hormona luteinizante (LH) (Wildeus, 2000; Islam, 2011), mientras que no interfieren con la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, ni con la luteólisis endógena. Por otra parte, la fase lútea puede acortarse mediante la administración de prostaglandinas que provocan la regresión del cuerpo lúteo (CL), una fuente endógena de progesterona (Wildeus, 2000; Islam, 2011).

ii. Esponjas intravaginales y vaginitis

En los pequeños rumiantes los métodos más empleados para la administración de P4 o progestágenos son los dispositivos de aplicación intravaginal conocidos como CIDR (*Controlled Internal Drug Release*) o las esponjas (EIV) hechas de poliuretano de alta densidad (PUAD) (Manes y Ungerfeld, 2015). Estas últimas se impregnan de acetato de medroxiprogesterona (MPA), o de acetato de fluorogestona (FGA o cronolona) (Whitley y Jackson, 2003; Barrera y Porras, 2013; González, 2014). Sin embargo, diversos autores informan que las EIV causan vaginitis en las cabras y las borregas, a partir de los cinco días después de haber sido colocadas. Esto se observa al momento de retirar la esponja, como un flujo de color blanquecino a verdoso, en ocasiones hemorrágico, de olor putrefacto. La vaginitis puede ser ocasionada por cambios en el ambiente vaginal, atribuidos no sólo a la acción física del dispositivo (esponja), sino también a la constante absorción y retención de las secreciones vaginales en el mismo (Cortés *et al.*, 2013; Penna *et al.*, 2013; Manes y Ungerfeld, 2015). Se considera que esta infección es generada por la proliferación de la microbiota vaginal (Penna *et al.*, 2013), la cual está conformada por organismos saprófitos, que pueden llegar a ser patógenos al proliferar bajo las condiciones que genera la esponja en la vagina (daño mecánico en la mucosa e inflamación, y el consecuente estrés oxidativo) (Chvapil *et al.*, 1979; Sönmez *et al.*, 2009; Penna *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2014; Simões, 2015). Asimismo, la vaginitis podría ser favorecida por el efecto inmunosupresor de la P4 o de sus análogos (Lewis, 2003; Gatti *et al.*, 2011), aunque algunos autores indican que estos no afectan el desarrollo bacteriano (Cortés *et al.*, 2013).

Se han llevado a cabo varios experimentos que informan sobre los cambios en la microbiota vaginal al inicio y al final del tratamiento sincronizador del estro con progestágenos locales. Manes *et al.* (2010, 2013) y Majeed *et al.* (2012) señalan que la proporción entre bacterias Gram positivas y Gram negativas se altera al utilizar dispositivos intravaginales impregnados con P4 o sus análogos durante 7 o 14 días, y que el incremento en la proporción de las bacterias Gram negativas puede tener un efecto negativo en la fertilidad (Gatti *et al.*, 2011). Además, se han aislado bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Trueperella pyogenes*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp., *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptococcus* sp. y *Staphylococcus* spp. a partir de los hisopados vaginales tomados después de 14 días de tratamiento con FGA o MPA (Majeed *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2013; Penna *et al.*, 2013). También se ha informado que las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la microbiota vaginal aumentan en número al término del tratamiento (G. Martins *et al.*, 2009; Gatti *et al.*, 2011; Gatti y Ungerfeld, 2012; Cortés-López *et al.*, 2013).

El uso de esponjas parece no sólo favorecer la proliferación de la microbiota vaginal, sino también causar alteraciones en la mucosa, enrojecimiento, irritación y úlceras (González, 2014), e incrementar la infiltración de células epiteliales, de eritrocitos, de neutrófilos y de linfocitos; así como, hiperplasia e hipertrofia epitelial (Manes y Ungerfeld, 2015). Tanto el daño a las mucosas, como la proliferación microbiana, favorecen la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) y asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés), que promueven la liberación de citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1, IL-6, IL-

18 y el TNF, que permiten el reclutamiento de los leucocitos a la zona afectada (Mogensen, 2009; Roh y Sohn, 2018).

iii. Jalea Real

La jalea real de la abeja *Apis mellifera* (JR) es una secreción viscosa de color amarillo-blanquecina con olor característico a fenol y sabor pungente (Melliou y Chinou, 2014; Fratini *et al.*, 2016). Es producida por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras jóvenes y es utilizada para alimentar a las larvas durante sus primeros tres días de vida, y a la reina durante toda su vida (Mishima *et al.*, 2005; Melliou y Chinou, 2014; Fratini *et al.*, 2016). La JR es un coloide ácido (3.6-4.2 pH), compuesto principalmente por agua (60-70%), carbohidratos (11-23%), proteínas (9-18%), ácidos grasos y lípidos (4-8%), junto con pequeñas porciones de sales, vitaminas y otras sustancias desconocidas, presentes en trazas, que en conjunto componen del 0.8% al 3% de la mezcla (Fratini *et al.*, 2016).

Debido a sus efectos farmacológicos (antioxidantes, neurotróficos, hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, hepatoprotectores, hipotensores, inmunomoduladores, antialérgicos, antiinflamatorios y antimicrobianos), la JR es utilizada en la medicina tradicional de diversas culturas. Con relación a su posible efecto antimicrobiano cuando la JR es ingerida oralmente, no existen experimentos controlados que lo evidencien (Pavel *et al.*, 2011). Las investigaciones realizadas *in vitro* muestran sin embargo un claro efecto antibiótico, que se atribuye a los siguientes péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) y a un ácido graso:

- Royalisina: es un AMP de la JR de *Apis mellifera* que corresponde a una defensina. Pesa 5523 Daltones (Da) y cuenta con tres puentes disulfuro, los cuales le dan una estructura compacta y le otorgan alta estabilidad a bajo pH y a altas temperaturas, conservando incluso sus efectos antibióticos tras ser sometida a una temperatura de 100 °C durante 15 min (Fujiwara *et al.*, 1990; Ratanavalachai, *et. al*, 2002; Fratini *et al.*, 2016). Actúa principalmente en bacterias Gram positivas aunque también puede funcionar contra Gram negativas (Ratanavalachai *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2004; Eshraghi, 2005; Melliou y Chinou, 2014; Bílikova *et al.*, 2015).
- Jaleínas I-IV: son AMPs que se obtienen tras la lisis de la proteína principal de la Jalea Real (MRJP1 por sus siglas en inglés) y que actúan tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas (Fontana *et al.*, 2004; Fratini *et al.*, 2016).
- Ácido 10-Hidroxi-2-decenóico (10-HDA): es un ácido graso insaturado de cadena corta (Ramadan y Al-Ghamdi, 2012; Melliou y Chinou, 2014; Fratini *et al.*, 2016), que inhibe a algunas bacterias Gram, positivas y negativas (Eshraghi, 2005; Fratini *et al.*, 2016). A este ácido también se le han atribuido propiedades inmunomoduladoras, como la disminución de la producción de la citocina IL-6 inducida por los lipopolisacáridos (LPS) en macrófagos (Sugiyama *et al.*, 2012).

La JR tiene también propiedades estrogénicas, por lo que puede utilizarse en las EIV para sincronizar el estro en cabras exitosamente (Castro, 2019)

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano y antiinflamatorio de la JR impregnada en esponjas de poliuretano, que se colocaron intravaginalmente a cabras, durante nueve días, en la época de anestro. La población bacteriana (UFC) se determinó a partir de hisopados vaginales, mientras que el proceso inflamatorio se evaluó a partir de citologías vaginales.

III. Hipótesis

La JR de *Apis mellifera* impregnada en esponjas de PUAD, utilizadas para la inducción del estro en animales anéstricos, disminuye la carga bacteriana y la inflamación que se observa en la vagina de la cabra doméstica (*Capra hircus*) después del tratamiento.

IV. Objetivos

Evaluar el efecto antibiótico de la JR impregnada en esponjas de poliuretano sobre la carga bacteriana de la vagina, mediante un conteo de las unidades formadoras de colonias y la identificación de bacterias, a partir de cultivos de hisopados vaginales tomados antes y después de un tratamiento de nueve días.

Describir y evaluar las diferencias en las poblaciones de las células inflamatorias presentes en la mucosa vaginal después de un tratamiento de nueve días con esponjas de PUAD.

V. Materiales y Métodos

i. Lugar de realización

El estudio fue realizado en el hato caprino del Centro de Enseñanza, Producción e Investigación en Producción y Sanidad Animal (CEPIPSA) de la FMVZ-UNAM, localizado en Av. Cruz Blanca, San Miguel Topilejo, alcaldía Tlalpan, 14500, Ciudad de México.

Los cultivos microbiológicos e identificación de patógenos se llevaron a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

ii. Animales y tratamientos

Se emplearon 18 hembras caprinas, clínicamente sanas, de la raza Toggenburg y sus cruzas, con edades entre los cuatro y los siete años, todas en anestro estacional. Para formar los grupos experimentales se hizo una selección aleatoria. Seis de las hembras se trataron con esponjas comerciales de Cronogest® (grupo Cr), seis con EIV de PUAD impregnadas con JR (grupo JR), y seis con EIV de PUAD sin principio activo (grupo PUAD).

iii. Preparación de las esponjas

Preparación de las esponjas impregnadas con JR:

La Jalea Real se obtuvo del apiario “El ave fénix”, localizado en el pueblo de San Bartolo, ubicado en la alcaldía Milpa Alta de la Ciudad de México, manteniéndose en congelación hasta su aplicación a las esponjas.

Las esponjas de poliuretano se esterilizaron en autoclave (121 °C/15 libras/in²/15 min) y posteriormente se impregnaron con la jalea real (12 g) en condiciones de esterilidad. Finalmente, se sometieron a un proceso de deshidratación en una incubadora a 37°C durante 48 h, condiciones que no afectaron las propiedades de los péptidos o ácidos grasos contenidos en la JR, pero que aseguraron que la JR permaneciera impregnada en la esponja, evitando las pérdidas que pudieran ocurrir con la JR fluida al comprimir la esponja para su colocación en la vagina. Las esponjas se almacenaron finalmente en bolsas estériles de polipapel a temperatura ambiente hasta su uso.

Preparación de las esponjas sin JR (grupos CR y PUAD):

Las esponjas del grupo PUAD se esterilizaron en autoclave con las condiciones mencionadas anteriormente. Todas se almacenaron en bolsas estériles de polipapel a temperatura ambiente hasta su uso. Las esponjas de Cronogest CR® no se sometieron a ningún tratamiento de esterilización y se utilizaron directo de su empaque.

iv. Aplicación de las esponjas

Para aplicar la esponja, de la manera más estéril posible, se desinfectó la región de la vulva con una solución de clorhexidina al 5%. Las esponjas fueron sacadas de sus empaques respectivos y manejadas con guantes nuevos para introducirlas al aplicador de esponjas. Este último, junto con el émbolo y vástago, fueron desinfectados en una solución de clorhexidina al 5% entre cada aplicación.

v. Toma de muestras

Para el estudio microbiológico, se realizó un hisopado vaginal a cada cabra, en la región anterior de la vagina, ejecutado de la misma manera y por la misma persona, antes de colocar las esponjas intravaginales (día 0). Al final del tratamiento (día 9), se siguió el mismo proceso después de retirar la esponja. Los hisopados se transportaron al laboratorio (1-2 horas) en 2 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9%, en refrigeración a 4°C.

Un segundo hisopado vaginal, obtenido de manera similar a la descrita anteriormente, se utilizó para realizar una citología vaginal exfoliativa (CVE) por cabra en cada uno de los momentos de estudio (día 0 y día 9). Dichas CVE se tiñeron con la técnica *Diff-Quick*, y se observaron a 400 aumentos, para determinar y cuantificar los tipos celulares.

vi. Conteo e identificación de bacterias

Las muestras de los hisopados se sembraron inmediatamente al llegar al laboratorio, mediante la técnica de estría cruzada -para la identificación de colonias puras-; y mediante el método *Miles & Misra* -para el conteo de UFC-. En ambos casos se emplearon agares nutritivos enriquecidos con sangre de bovino al 5%, los cuales se incubaron en microaerobiosis durante 48 h.

vii. Interpretación de las CVE

Las citologías del día 0 se interpretaron usando como referencia la descripción de las poblaciones celulares vaginales durante el anestro de Pretorius (1977).

Brevemente, ésta agrupa a las cabras de la siguiente manera:

Anestro temprano: hay escasa o nula celularidad (0/+). Las células epiteliales, en su mayoría escamosas nucleadas, predominan por sobre los leucocitos.

Anestro intermedio: hay de escasa a moderada celularidad (+/+++). Las células epiteliales, conformadas principalmente por células parabasales y escamosas nucleadas, predominan por sobre los leucocitos.

Anestro tardío: hay moderada celularidad (+++). La proporción entre leucocitos y células epiteliales es similar.

No clasificable: se clasificó dentro de este grupo a las CVE de cabras que presentaban poblaciones celulares no correspondientes a las clasificaciones anteriores.

Estas citologías también se utilizaron para eliminar del estudio a las cabras que cursaran, previo al tratamiento, con un proceso inflamatorio en la vagina (neutrófilos \leq +++++).

El grado de inflamación se evaluó en las citologías del día 9 considerando la población de leucocitos presentes en 6 campos distintos de las laminillas. Las categorías fueron las siguientes:

Inflamación moderada (IM): +/++

Inflamación severa (IS): \geq +++

Asimismo, se realizó una descripción de las poblaciones celulares en la CVE, presentes al momento del retiro contemplando, además de los leucocitos, eritrocitos, y células epiteliales.

viii. Análisis estadístico

La presencia de hemorragia en el exudado, la incidencia de géneros bacterianos, y el grado de inflamación al final del tratamiento fueron analizados con la prueba de *Chi cuadrada*. Los resultados de las UFC se compararon entre grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) después de ser transformados logarítmicamente ($\text{Log}_{10} + 1$) para normalizar la distribución de los datos y obtener homocedasticidad. La prueba exacta de Fisher se utilizó para determinar el cambio en las proporciones entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre el inicio y el final del tratamiento, según su incidencia en ambos momentos.

Todas las pruebas fueron realizadas utilizando el programa estadístico R. Se consideraron diferencias estadísticas con una $P \leq 0.05$.

VI. Resultados

i. Exudados vaginales y Citologías Vaginales Exfoliativas

Ninguna cabra mostró descarga de exudado vaginal previa al tratamiento. Al examen microscópico 15 de las 18 cabras presentaron una población celular correspondiente al anestro en el día 0 (Anexo 1), mientras que las tres CVE restantes no pudieron ser categorizadas con los parámetros establecidos: la cabra PUAD 3 presentó una población celular compuesta únicamente por células

epiteliales cornificadas; la cabra PUAD 4 tuvo una población compuesta, casi en su totalidad, por células parabasales, muchas de estas agrupadas; y la cabra JR 4 presentó una población de leucocitos preponderante por sobre la de las células epiteliales; además de una abundante celularidad ($\geq+++$) y eritrocitos infiltrados. Todos los leucocitos presentes fueron neutrófilos.

Se decidió eliminar a la cabra JR 4 del análisis estadístico, debido a que fue el único animal que al momento de iniciar el tratamiento ya tenía un proceso inflamatorio.

Al final del tratamiento (Anexo 2), todas las cabras presentaron un exudado líquido, fétido y de color amarillento-blanquecino. En el exudado se encontró sangre fresca en el 66.6% (4/6 animales), 83.33% (5/6 animales) y 20% (1/5) de las muestras de los grupos Cr, PUAD y JR respectivamente. La presencia de hemorragia en el exudado no difirió entre los tratamientos ($P = 0.09293$).

Independientemente del tratamiento, las CVE se encontraron principalmente células epiteliales nucleadas escamosas y por leucocitos. Sin embargo, la muestra de la cabra JR 2 fue insuficiente para hacer una descripción de la población celular, por lo que su citología se descartó del estudio. En las CVE hubo presencia de eritrocitos en 5 de las 6 muestras en los grupos CR y PUAD, y en las 4 muestras restantes de las citologías del grupo JR. En todos los grupos se encontró un aumento en la cantidad de células epiteliales; así como un mayor número de leucocitos, tanto en individuos con exudado hemorrágico como en los que no mostraron hemorragia. El cuadro 1 muestra la proporción de los grados de inflamación presente en las citologías. No se encontraron diferencias en el grado de inflamación entre tratamientos ($P=0.09$).

Cuadro 1. Grado de inflamación en el epitelio vaginal de las hembras tratadas con esponjas impregnadas con Cronolona (Cr), sin principio activo (PUAD) o con Jalea Real (JR), al día del retiro del dispositivo.

Grado de inflamación	Tratamientos		
	Cr (6)	PUAD (6)	JR (4)
Moderado	5	5	1
Severo	1	1	3

ii. Unidades formadoras de colonias y aislamientos bacterianos

Las UFC (datos transformados) en los grupos Cr, PUAD y JR antes del tratamiento (D0) mostraron medias de 3.728 (\pm 0.5019313), 3.026 (\pm 1.611648), y 2.257 (\pm 0.148902) UFC/ml, respectivamente. Al final del tratamiento (D9), se mostró un incremento en las UFC/ml en todos los grupos, con promedios de 7.856 (\pm 1.005507), 7.776 (\pm 1.167257), y 7.403 (\pm 0.822836), para los grupos Cr, PUAD y JR, respectivamente (Figura 1). El ANOVA indica que no existen diferencias en el número de UFC entre los grupos antes ($p=$ 0.157) o después del tratamiento ($p=$ 0.747) (Anexo 3, Cuadros A-F).

La figura 2 muestra las poblaciones bacterianas y el número de UFC que conformaban la microbiota vaginal aerobia de los distintos grupos tratados, en ambos tiempos de muestreo. Al inicio del tratamiento las bacterias detectadas fueron principalmente *Staphylococcus* spp. coagulasa negativo (SCoN) en 9 de 17 cabras; *Corynebacterium pseudotuberculosis*, en 9 de 17; *Moraxella* spp. en 2 de 17; *E. coli* en 1 de 17 y *Trueperella pyogenes* también en 1 de 17 cabras. Mientras que al final del tratamiento las bacterias detectadas fueron *T. pyogenes* en 14 de 17 cabras; SCoN en 9 de 17 cabras; *E. coli* en 1 de 17 cabras y *C. pseudotuberculosis*

en 1 de 17 cabras. No se encontró una relación entre los tratamientos y las bacterias presentes al final de los mismos: *T. pyogenes* ($P=0.2875$), SCoN ($P=0.1749$), *E. coli* ($P=0.3776$) y *C. pseudotuberculosis* ($P= 0.2794$).

Antes del tratamiento, hubo 17 aislamientos de bacterias Gram positivas, y 3 de Gram negativas, mientras que al final del tratamiento, hubo 23 aislamientos de Gram positivas y 1 Gram negativa, predominando las Gram positivas antes y después del tratamiento. No hay evidencia para indicar que la proporción de ambos tipos de bacterias se vea afectada por el tratamiento con EIV ($P = 0.3327$).

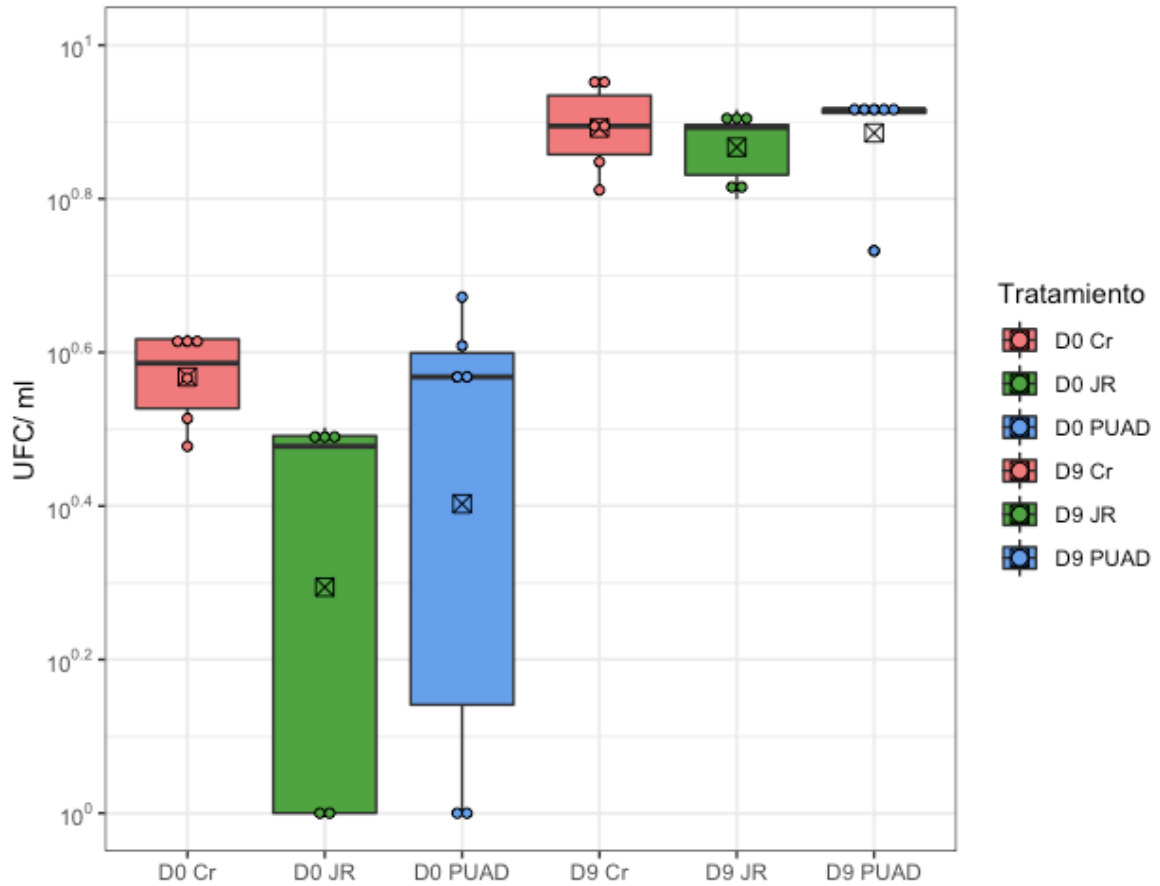


Figura 1. Rango de los valores del conteo de bacterias, expresado como Unidades Formadoras de Colonias/ml, antes (D0) y después (D9) de los tratamientos, en las cabras de los grupos Cr (cronolona), JR (Jalea Real y PUAD (Poliuretano de Alta Densidad sin principio activo). Se muestran la mediana (—) y el promedio (⊠) de cada grupo. Las esponjas intravaginales permanecieron *in situ* durante 9 días. Los datos mostrados han sido transformados ($\text{Log}_{10} + 1$).

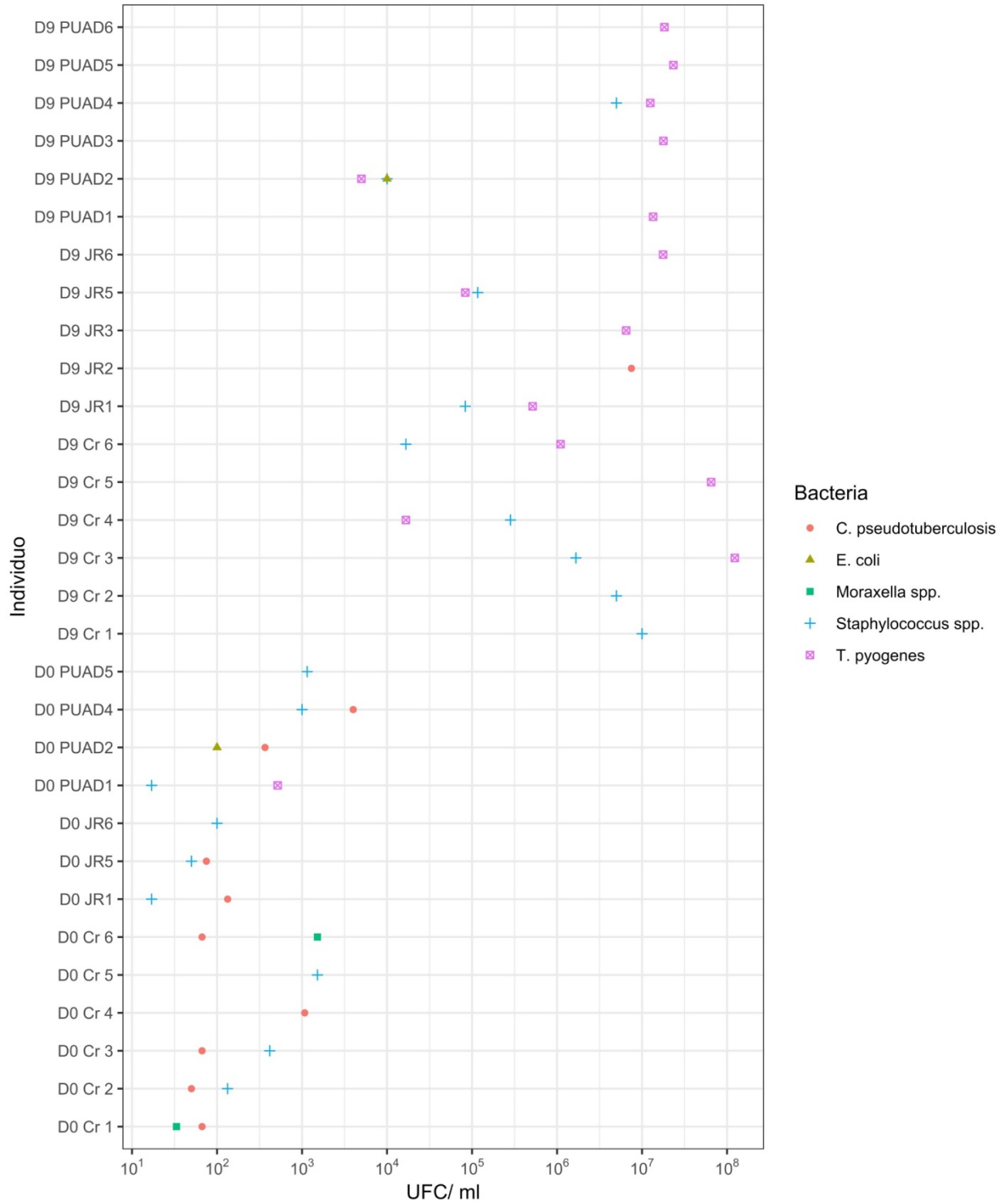


Figura 2. Presencia de los géneros bacterianos y el número de UFC/ml entre los individuos experimentales, antes (D0) y después (D9) del tratamiento en las cabras de los grupos Cr (cronolona), JR (Jalea Real) y PUAD (Poliuretano de Alta Densidad sin principio activo). Al día 0, las muestras de las cabras JR 2 y PUAD 3 no mostraron crecimiento bacteriano.

VII. Discusión

El presente trabajo muestra que la JR impregnada en EIV no disminuye la carga bacteriana de la vagina al retirar la esponja en cabras tratadas durante 9 días. Diversos trabajos indican que el tratamiento con EIV incrementa las concentraciones bacterianas en la vagina de cabras y borregas (Manes *et al.*, 2010, 2013; Gatti *et al.*, 2011; Majeed *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2013; Penna *et al.*, 2013; González, 2014; Manes & Ungerfeld, 2015;). Existen estudios que intentan atacar este problema y disminuir la carga bacteriana observada al retiro de la esponja; por ejemplo, Gatti *et al.* (2011) mostraron que se puede usar oxitetraciclina impregnada en las EIV (.02 mg) para disminuir el número de UFC/ml observadas al retiro del dispositivo.

Las propiedades antimicrobianas *in vitro* de la JR han sido ampliamente demostradas (Fujiwara *et al.*, 1990; Ratanavalachai *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2004; Eshraghi, 2005; Ramadan & Al-Ghamdi, 2012; Melliou y Chinou, 2014; Bílikova *et al.*, 2015; Fratini *et al.*, 2016;). Sin embargo, éste es el primer trabajo que contempla valorar dichas propiedades en un tratamiento intravaginal, sin que pudiera observarse un efecto benéfico.

Las probables razones por las cuales la JR no funcionó para disminuir la proliferación bacteriana en este experimento pueden ser diversas. Aunque se ha demostrado el efecto antimicrobiano de la royalisina y las jaleínas *in vitro* (Fontana *et al.*, 2004; Eshraghi, 2005; Bílikova *et al.*, 2015;). Hancock y Sahl (2006) señalan que aun cuando los péptidos catiónicos tienen actividad antimicrobiana en soluciones amortiguadoras o en diluciones, no necesariamente se comportan de

igual forma en condiciones fisiológicas, debido a que la actividad antimicrobiana de algunos de ellos es antagonizada por Ca^{++} y Mg^{++} (concentraciones fisiológicas de 1-2 mM), así como por Na^+ y K^+ que causan una osmolaridad mayor o igual a los 187 mOsm/L. Similarmente, la presencia de mucinas, polianiones y glucosaminoglicanos en los fluidos corporales puede reducir la capacidad antimicrobiana de algunas de las moléculas mencionadas (Hancock y Sahl, 2006). Por ello sugieren que el término de AMPs debe ser reservado para péptidos cuyo efecto antimicrobiano ha sido evaluado en condiciones similares a las fisiológicas, situación que no se ha cumplido con los AMPs de la JR. Por lo tanto, una posibilidad en el presente estudio es que los AMPs de la JR hayan sido inactivados en el moco vaginal de la cabra. Si bien no existen datos sobre las características de la composición del moco en la especie, y menos bajo condiciones infecciosas, se ha reportado que en vacas el moco vaginal tiene una osmolaridad promedio de 349 mOsm/l (Olds y Vandemark, 1957), y que la defensina humana recombinante rHD-5 (también caracterizada como AMP), se inactiva en soluciones de 187 mOsm/l de NaCl (Porter *et al.*, 1997). Además, las concentraciones de Ca^{++} (76.63 $\mu\text{g/ml}$) y Mg^{++} (24.16 $\mu\text{g/ml}$) (Tsiligianni *et al.*, 2002) alcanzan 1.912 mM y 0.944 mM respectivamente en el moco vaginal de la vaca, pudiendo inactivar a los AMPs o reducir su efectividad. Si el moco vaginal en la cabra tuviera características similares a las de las vacas, los AMPs de la JR podrían haberse inactivado, pero se requieren estudios para poder concluir lo anterior.

Otra condición que disminuye la efectividad de los AMPs es la actividad de enzimas proteolíticas. Se ha demostrado que la familia de catepsinas elastolíticas B, L y S, presentes en la fibrosis pulmonar quística (FPQ), son capaces de degradar las

defensinas β Humanas -2 y -3 (H β D-2, H β D-3) (Taggart *et al.*, 2003). Aunque esto se ha descrito en la FPQ, también se ha reportado la presencia de catepsinas B, D y G en la vagina de la mujer (Jais *et al.*, 2017), por lo que sería de interés estudiar si estas proteasas se encuentran presentes en el fluido vaginal de los animales, o si son liberadas durante los procesos de vaginitis bacteriana y traumática, como ocurre en la FPQ.

Respecto al 10-HDA, tampoco se encontraron estudios que evaluaran su efectividad antimicrobiana *in vivo*. Los estudios farmacológicos sobre este ácido graso han evidenciado que, cuando es administrado oralmente, es metabolizado en el hígado (Yamaga *et al.*, 2019), mas no existe evidencia de que el 10-HDA sea metabolizado cuando es aplicado en mucosas ni tampoco de que sus metabolitos tengan actividad antimicrobiana. Con la evidencia literaria que existe, no nos es posible afirmar si el 10-HDA fue metabolizado e inactivado en la vagina.

Un punto más que debería evaluarse es si la cantidad de JR administrada fue insuficiente para disminuir el conteo de bacterias observadas al final del tratamiento, por lo que deberán hacerse estudios para determinar si una concentración mayor es capaz de tener el efecto deseado.

Dado que la IL-6 favorece el reclutamiento de leucocitos durante la fase aguda de la inflamación (Choy y Rose-John, 2017) y que se ha demostrado en estudios *in vitro* que el 10-HDA de la JR disminuye la producción de dicha citocina en macrófagos estimulados con LPS (Sugiyama *et al.*, 2012), se decidió evaluar si existían diferencias en la cantidad de leucocitos -relacionándolos con el grado de inflamación- entre los distintos grupos (Cr, JR y PUAD). Sin embargo, el efecto

inhibitorio del 10-HDA anteriormente citado no pudo ser observado, y consecuentemente, no existieron diferencias en los procesos inflamatorios entre los grupos. Lo anterior pudo deberse a que la mayoría de los aislamientos bacterianos en este estudio fueron Gram positivos, por lo que el proceso inflamatorio podría estar estimulado por rutas activadas por PAMPs, y a DAMPs provocados por la esponja en vez de ser activados por los LPS.

En caso de que el 10-HDA no hubiera sido inactivado, como se propuso previamente, sería importante considerar que su efecto inhibitorio sobre la IL-6 descrito *in vitro* no es comparable a la diversidad de factores involucrados *in vivo*, por lo que tendría que realizarse un estudio que controle las poblaciones bacterianas para evidenciar su efecto antiinflamatorio *in vivo*. Una alternativa sería medir las concentraciones de distintas citocinas para determinar si existen diferencias en el proceso inflamatorio de los distintos grupos.

Los trabajos revisados para este estudio (Majeed *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2013; Manes *et al.*, 2013; Penna *et al.*, 2013) no describen las especies de la microbiota vaginal previas al tratamiento con EIV, pero Manes *et al.* (2010, 2013) y Majeed *et al.* (2012) proponen que existen cambios entre las proporciones de aislamientos de bacterias Gram positivas y Gram negativas entre el inicio y el final del tratamiento. Un hallazgo incidental en este trabajo es que, contrario a lo descrito por Manes *et al.* (2010, 2013), no existió un cambio en estas proporciones, ya que en ambos momentos del estudio e independientemente de los tratamientos, predominaron las bacterias Gram positivas. Lo que sí se observó fue un cambio en la proporción de *C. pseudotuberculosis* y *T. pyogenes*, aisladas a partir de los hisopados vaginales:

antes de aplicar la esponja predominaron *C. pseudotuberculosis*, y *Staphylococcus* spp. (9 cabras de 17, en ambos casos) y hubo un solo aislamiento de *T. pyogenes*, mientras que al momento del retiro de la esponja predominó *T. pyogenes* (14 de 17), *Staphylococcus* spp. se mantuvo sin cambios y los aislamientos de *Corynebacterium* se redujeron a 1 de 17. Esta información sugiere que la EIV genera condiciones en la vagina que pudieran favorecer la incidencia y proliferación de determinados géneros bacterianos, sin que necesariamente se vinculen a las características propias de las bacterias que se relacionan a la tinción de su pared celular. El aumento en la incidencia de los géneros de bacterias Gram negativas en otros estudios, pudiera tener relación con diferencias en el modelo experimental. Las bacterias aisladas al retiro del tratamiento en este estudio -SCoN, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *E. coli* y *T. pyogenes*- coinciden con algunas de las reportadas por Manes *et al.* (2010, 2013), Majeed *et al.* (2012), Penna *et al.* (2013) y Cortés *et al.* (2013). Al final del tratamiento no se aisló ninguna bacteria que no hubiera sido aislada antes del tratamiento. Sin embargo, no todos los géneros bacterianos se encontraron en todas las hembras. Un hallazgo atípico es el de la *Moraxella* spp, pues es una bacteria del aparato respiratorio (Kodjo *et al.*, 1997), y de la cual no se encontraron reportes en el aparato genitourinario. Sin embargo, ésta solamente se encontró en dos animales, y no fue aislada nuevamente después del tratamiento. Sería interesante realizar más muestreos de las hembras del corral para determinar si forma parte de la microbiota vaginal del hato.

El presente estudio también sugiere que la proliferación bacteriana no se ve favorecida por la presencia de Cronolona en el dispositivo intravaginal -coincidiendo

con lo reportado por Cortés *et al.* (2013). Al respecto, existen estudios que evidencian el efecto inmunosupresor de la progesterona y los progestágenos a través de la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-6 e IFN- γ , la inhibición de la síntesis de la Ciclooxygenasa-2, y la supresión de linfocitos no estimulados (Lewis, 2003; Hudić *et al.*, 2009; Hardy *et al.*, 2015). Sin embargo, la proliferación bacteriana no difirió entre los grupos de este estudio.

Dado que las esponjas de los tratamientos JR y Cr contienen análogos de progesterona o esteroides, se esperaba que la CVE al final del tratamiento se asemejara a lo que se encuentra en el diestro intermedio (células escamosas nucleadas y leucocitos en poca cantidad). Sin embargo, esto no se observó en el estudio dado que la cantidad de células epiteliales y leucocitos al retiro de la esponja era elevada, debido al efecto irritante del dispositivo sobre el epitelio, por lo que no se puede atribuir esta población al efecto de la Cronolona ni a los esteroides en la JR.

La presencia de trazas de sangre fresca al momento de retiro de la esponja observada en algunas cabras en este estudio puede relacionarse con la formación de adherencias (Martins *et al.*, 2010). Sin embargo, no se encontró relación entre este sangrado y el tratamiento aplicado.

VIII. Conclusiones

La JR impregnada en esponjas intravaginales no disminuyó la proliferación de la microbiota aeróbica vaginal o el grado de inflamación observados al final del tratamiento de inducción del estro de 9 días de duración. Ante la falta de información

de estudios que demuestren la viabilidad de los principios activos de la JR bajo condiciones similares a las fisiológicas, es necesario estudiar los efectos antimicrobianos de la JR bajo condiciones apropiadas de osmolaridad, presencia mucinas, o bajo actividad proteolítica *in vitro*, así como evaluar de la actividad antiinflamatoria del 10-HDA bajo una estimulación únicamente de bacterias Gram negativas *in vivo*.

IX. Anexos

Anexo 1.

Poblaciones celulares obtenidas en la CVE de cabras antes del tratamiento de inducción del estro (Día 0). Se mencionan primero las células epiteliales: parabasales (PB), nucleadas escamosas (NE) y cornificadas (C) y su participación en el porcentaje global de celularidad de la muestra. Posteriormente se enlistan los leucocitos presentes en el frotis y su diagnóstico diferencial: neutrófilos (N), linfocitos (L) y macrófagos (M).

ID	Celularidad								%Total	Global	Clasificación	Observaciones
	Células epiteliales				Leucocitos							
	PB	EN	C	%	N	L	M	%				
Cr 1	28%	72%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	++	Anestro temprano	-
Cr 2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
Cr 3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
Cr 4	10%	90%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	+	Anestro temprano	-
Cr 5	2%	58%	6%	66%	34%	0%	0%	34%	100%	+++	Anestro temprano	-
Cr 6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
PUAD 1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
PUAD 2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
PUAD 3	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	+	No clasificable	-
PUAD 4	90%	9%	0%	99%	1%	0%	0%	1%	100%	++	No clasificable	-

PUAD 5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
PUAD 6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
JR 1	16%	84%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	+	Anestro temprano	-
JR 2	44%	56%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	+	Anestro Intermedio	-
JR 3	4%	96%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	+	Anestro temprano	-
JR 4	0%	19%	0%	19%	81%	0%	0%	81%	100%	100%	+++++	No clasificable	Presencia de eritrocitos
JR 5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	0	Anestro temprano	-
JR 6	5%	42%	0%	46%	54%	0%	0%	54%	100%	100%	+++	Anestro tardío	-

Anexo 2.

Poblaciones celulares obtenidas en la CVE de cabras después del tratamiento de inducción del estro (Día 9). Se mencionan primero la cantidad de conglomerados celulares presentes, los cuales están compuestos por células epiteliales y por células inflamatorias. Posteriormente se enlistan el tipo de células epiteliales distinguibles en el frotis: escamosas nucleadas (EN) y parabasales (PB) y su cantidad. En tercer lugar, se enlistan los leucocitos visibles y su diferencial: neutrófilos (N), linfocitos (L) y macrófagos (M); así como su cantidad; el grado de inflamación moderada (IM) o severa (IS), y finalmente la cantidad de eritrocitos.

ID	Celularidad									
	Conglomerados celulares	Células epiteliales		Leucocitos				Eritrocitos		
	Cantidad	Predominancia	Cantidad	N	L	M	%	Cantidad	GI	Cantidad
Cr 1	10	EN	+	100%	0%	0%	100%	+	IM	+
Cr 2	11	EN y PB	Escasos	100%	0%	0%	100%	+	IM	++
Cr 3	40	EN	+	88%	10%	2%	100%	++	IM	++
Cr 4	13	EN	++	74%	20%	6%	100%	++	IM	++
Cr 5	1	EN	+	100%	0%	0%	100%	+	IM	-
Cr 6	25	EN	+	100%	0%	0%	100%	++++	IS	+
PUAD 1	21	EN	+	80%	5%	15%	100%	+	IM	++++
PUAD 2	4	EN y PB	+	90%	10%	0%	100%	++	IM	++++
PUAD 3	0	EN	+++	100%	0%	0%	100%	++	IM	++
PUAD 4	15	EN	++	100%	0%	0%	100%	+++	IS	-
PUAD 5	21	EN	++	100%	0%	0%	100%	++	IM	++
PUAD 6	9	EN	++	100%	0%	0%	100%	++	IM	++
JR 1	4	EN	+	98%	0%	2%	100%	+++	IS	+
JR 2	Muestra insuficiente									
JR 3	34	EN		100%	0%	0%	100%	++++	IS	++++
JR 4	Incontables	Indistinguibles	++++	100%	0%	0%	100%	++++	IS	++++
JR 5	10	EN	+	100%	0%	0%	100%	++++	IS	+
JR 6	11	EN	++	100%	0%	0%	100%	++	IM	++

N.B. La CVE de las cabras JR 2 y JR 4 no fue incluida en el estudio.

Anexo 3.

UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras de los grupos Cr, PUAD y JR antes y después del tratamiento de inducción del estro (Cuadros A-F).

Cuadro A. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo Cr antes del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
Cr 1	0	0	67	33	0	0	0	100
Cr 2	133	0	50	0	0	0	0	183
Cr 3	417	0	67	0	0	0	0	483
Cr 4	0	0	1075	0	0	0	0	1075
Cr 5	1517	0	0	0	0	0	0	1518
Cr 6	0	0	67	1517	0	133	0	1584
Información estadística								
Min	0	0	0	0	0	0	0	100
Mediana	67	0	67	0	0	0	0	779
Media	344	0	221	258	0	22	0	824
Max	1517	0	1075	1517	0	133	0	1584
Varianza	355963	0	175771	380194	0	2963	0	434133.5
D.E.	597	0	419	617	0	54	0	658.8

Cuadro B. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo Cr después del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
Cr 1	10000000	0	0	0	0	0	0	10000000
Cr 2	5000000	0	0	0	0	0	0	5000000
Cr 3	1666667	123333333	0	0	0	0	0	125000000
Cr 4	283333	16667	0	0	0	0	0	300000
Cr 5	0	65000000	0	0	0	0	0	65000000
Cr 6	16667	1100000	0	0	0	0	0	1116667
Información estadística								
Min	0	0	0	0	0	0	0	300000
Mediana	975000	558333	0	0	0	0	0	7500000
Media	2827778	31575000	0	0	0	0	0	34402778
Max	10000000	123333333	0	0	0	0	0	125000000
Varianza	15976074074074	269108752777778	0	0	0	0	0	257500604629630
D.E.	3997008	51875693	0	0	0	0	0	50744517

Cuadro C. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo PUAD antes del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
PUAD 1	17	517	0	0	0	0	0	533
PUAD 2	0	0	367	0	100	0	0	467
PUAD 3	0	0	0	0	0	0	0	0
PUAD 4	1000	0	4000	0	0	0	0	5000
PUAD 5	1150	0	0	0	0	0	0	1150
PUAD 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Información estadística								
Min	0	0	0	0	0	0	0	0
Mediana	8	0	0	0	0	0	0	500
Media	361	86	728	0	17	0	0	1192
Max	1150	517	4000	0	100	0	0	5000
Varianza	308074	44491	2591296	0	1667	0	0	3660861
D.E.	555	211	1610	0	41	0	0	1913

Cuadro D. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo PUAD después del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
PUAD 1	0	13500000	0	0	0	0	0	13500000
PUAD 2	10000	5000	0	0	10000	0	0	25000
PUAD 3	0	17833333	0	0	0	0	0	17833333
PUAD 4	5000000	12500000	0	0	0	0	0	17500000
PUAD 5	0	23333333	0	0	0	0	0	23333333
PUAD 6	0	18333333	0	0	0	0	0	18333333
Información estadística								
Min	0	5000	0	0	0	0	0	25000
Mediana	0	15666667	0	0	0	0	0	17666667
Media	835000	14250833	0	0	1667	0	0	15087500
Max	5000000	23333333	0	0	10000	0	0	23333333
Varianza	4163350000000	63713170833333	0	0	16666667	0	0	64257604166667
D.E.	2040429	7982053	0	0	4082	0	0	8016084

Cuadro E. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo JR antes del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
JR 1	17	0	133	0	0	0	0	150
JR 2	0	0	0	0	0	0	0	0
JR 3	0	0	0	0	0	0	0	0
JR 4	0	0	233	0	0	0	50	283
JR 5	50	0	75	0	0	0	0	125
JR 6	100	0	0	0	0	0	0	100
Información estadística								
Min	0	0	0	0	0	0	0	0
Mediana	0	0	0	0	0	0	0	100
Media	23	0	73	0	0	0	10	75
Max	100	0	233	0	0	0	50	150
Varianza	1889	0	11333	0	0	0	500	5000
D.E.	43	0	106	0	0	0	22	70.71

N.B. Las muestras de la cabra JR 2 fueron descartadas del análisis estadístico.

Cuadro F. UFC/ ml de distintos géneros bacterianos en hisopados vaginales de cabras del grupo JR después del tratamiento de inducción del estro.

Individuo	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>E. coli</i>	Micrococos	<i>Klebsiella sp.</i>	Total
JR 1	83333	516667	0	0	0	0	0	600000
JR 2	0	0	7500000	0	0	0	0	7500000
JR 3	0	6500000	0	0	0	0	0	6500000
JR 4	0	0	0	0	516666667	0	0	516666667
JR 5	116667	83333	0	0	0	0	0	200000
JR 6	0	17666667	0	0	0	0	0	17666667
Información estadística								
Min	0	0	0	0	0	0	0	200000
Mediana	0	516667	0	0	0	0	0	6500000
Media	16667	4936667	1500000	0	103333333	0	0	109786667
Max	83333	17666667	7500000	0	516666667	0	0	17666667
Varianza	1388888889	58193666666667	11250000000000	0	(231060358) ²	0	0	50048555555556
D.E.	37268	7628477	3354102	0	231060358	0	0	7074500

N.B. Las muestras de la cabra JR 2 fueron descartadas del análisis estadístico.

X. Referencias

- Barrera, O. U., & Porras, J. L. (2013). Comparación de dos tratamientos a base de progestágenos para la sincronización de celos ovinos Comparisson of two protocols with progesterone insert for synchronization of estrus in ewes. *Ciencia y Agricultura, 10*, 9–16.
- Bílikova, K., Huang, S. C., Lin, I. P., Šimuth, J., & Peng, C. C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides, 68*, 190–196.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.001>
- Burns, J., Skinner, K., Colt, J., Sheidlin, A., Bronson, R., Yaacobi, Y., & Goldberg, E. (1995). Prevention of tissue injury and postsurgical adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions. *Journal of Surgical Research, 59*(6), 644–652.
- Castro, N. (2019). *Evaluación de la eficiencia reproductiva de cabras (Capra hircus) tratadas con esponjas intravaginales con jalea real de abejas (Apis mellifera) vs cabras tratadas con Controlled Internal Drug Release CIDR*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chemineau, P., Daveau, A., Cognié, Y., Aumont, G., & Chesneau, D. (2004). Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology, 4*, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1472-6793-4-12>
- Choy, E., & Rose-John, S. (2017). Interleukin-6 as a multifunctional regulator: Inflammation, immune response, and fibrosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders, 2*(Suppl 2), S1–S5. <https://doi.org/10.5301/jsrd.5000265>

- Chvapil, M., Chvapil, T. A., Owen, J. A., Kantor, M., & Eskelson, C. (1979). Reaction of Vaginal Tissue of Rabbits to Inserted Sponges Made of Various Materials * The history of sponges used as intravaginal contraceptive barrier inserted in the vagina to trap and inactivate the sperm . I O r interest. *Journal of Biomedical Materials Research*, 13, 1–13.
- Cortés-López, N. G., Abad-Zavaleta, J., Bravo-Delgado, H. R., Meza-Villalvazo, V. M., Sachman-Ruiz, B., García-Arellano, C., & Del Moral Ventura, S. T. (2013). Efecto del acetato de fluorogestona en la microbiota vaginal de borregas pelibuey en la cuenca del papaloapan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(3), 309–314.
- Eshraghi, S. (2005). An evaluation of the potent inhibitory effects of royal jelly fractions against *Streptomyces* bacteria. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 21(1), 63–68.
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M. T., & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 211–219.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.029>
- Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25(6), 919–928.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 192, 130–141.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>

- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K., ... Company, I. (1990). A Potent Antibacterial in Royal Jelly. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333–11337.
- Gatti, M., Zunino, P., & Ungerfeld, R. (2011). Changes in the Aerobic Vaginal Bacterial Mucous Load after Treatment with Intravaginal Sponges in Anoestrous Ewes: Effect of Medroxyprogesterone Acetate and Antibiotic Treatment Use. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 205–208. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01626.x>
- González Navarro, S. (2014). *Determinación de la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de una esponja intravaginal de fabricación casera elaborada con acetato de medroxiprogesterona para la sincronización del estro en ovinos de pelo*. Universidad Nacional Costa Rica.
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Hardy, D. B., Janowski, B. A., Corey, D. R., & Mendelson, C. R. (2015). *Progesterone Receptor Plays a Major Antiinflammatory Role in Human Myometrial Cells by Antagonism of Nuclear Factor- κ B Activation of Cyclooxygenase 2 Expression*. 20(November), 2724–2733. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0112>
- Hudić, I., Fatušić, Z., Szekeres-bartho, J., Balić, D., Polgar, B., Ljuca, D., & Dizdarević-Hudić, L. (2009). Progesterone-induced blocking factor and cytokine profile in women with threatened pre-term delivery. *American Journal of Reproductive Immunology*, 61(5), 330–337. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00699.x>

- Islam, R. (2011). Synchronization of estrus in cattle: A review. *Veterinary World*, 4(3), 136–141. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.136-141>
- Jais, M., Younes, N., Chapman, S., Cu-Uvin, S., & Ghosh, M. (2017). Reduced levels and bioactivity of endogenous protease cathepsin D in genital tract secretions of postmenopausal women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(5), 407–409. <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0240>
- Kodjo, A., Richard, Y., & Tønjum, T. (1997). *Moraxella boevrei* sp. nov., a new *Moraxella* species found in goats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 115–121. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-115>
- Lewis, G. S. (2003). Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-117>
- Majeed, A. F., Al-Rawi, H. M., Al-Kubaisi, S. M. A., & Al-Jumaily, T. M. N. (2012). Vaginal bacteria flora concurred with vaginal sponges in black Iraqi goats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 26, 123–124.
- Manes, J., Fiorentino, M. A., Hozbor, F., Paolicchi, F., Alberio, R., & Ungerfeld, R. (2013). Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrous synchronisation treatments in goats. *Animal Production Science*, 53(6), 555–559. <https://doi.org/10.1071/AN12191>
- Manes, J., Fiorentino, M. A., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R., Sanchez, E., & Paolicchi, F. (2010). Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research*, 94(1–3), 201–

204. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.021>

Manes, J., & Ungerfeld, R. (2015). Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones en ambiente vaginal y su relación con la fertilidad. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte*, 39(1), 104–108.

Martins, L. T., Santos Neto, P. C. dos, Gaudêncio Neto, S., Rauber, L. P., Bertolini, M., Vieira, A. D., & Mezzalira, A. (2010). Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Ciência Rural*, 40(2), 389–395. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010000200021>

Melliou, E., & Chinou, I. (2014). Chemistry and bioactivities of royal jelly. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 43, pp. 261–290). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00008-4>

Mishima, S., Suzuki, K.-M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M., & Miyata, T. (2005). Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.012>

Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>

Olds, D., & Vandemark, N. L. (1957). Composition of luminal fluids in bovine female

genitalia. *Fertility and Sterility*, 8(4), 345–354. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)32764-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)32764-9)

Pavel, C., Al. Mărghițaș, L., Otilia, B., Dezmirean, D., Șapcaliu, A., Radoi, I., & Mădaș, M. (2011). Biological Activities of Royal Jelly - Review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 108–118.

Penna, B., Libonati, H., Director, A., Sarzedas, A. C., Martins, G., Brandão, F. Z., ... Lilenbaum, W. (2013). Progesterin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Animal Reproduction Science*, 142(1–2), 71–74.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.006>

Pietroski, A. C. C. A., Brandão, F. Z., Souza, J. M. G. de, & Fonseca, J. F. da. (2013). Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(3), 168–173. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013000300004>

Porter, E. M., Valore, E. V., & Ganz, T. (1997). *Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Human Intestinal*. 65(6), 2396–2401.

Pretorius, P. S. (1977). Vaginal cytological changes in the cycling and anoestrous Angora goat doe. *Journal of the South African Veterinary Association*, 48(3), 169–171.

Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39–52.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>

Ratanavalachai, Treetip., Wongchai, V. (2002). Antibacterial Activity of Intact Royal Jelly, Its Lipid Extract and Its Defatted Extract. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 7(1), 5–12.

Rivera-Lozano, M. T., Escobar Medina, F. J., Díaz Gómez, M. O., Aréchiga Flores, C. F., Urrutia Morales, J., Gámez Vázquez, H. G., & Vera Ávila, H. (2006). ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA DE LA CABRA. *Publicación Anual de La Unidad Académica de Medicina Veterinaria*, 2(5), 217–228.

Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). *Origin and List of Damps*. 18(4), 1–14.

<https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>

Simões, J. (2015). Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2), 157–165.

Sönmez, M., Bozkurt, T., Türk, G., Gür, S., Kizil, M., & Yüce, A. (2009). The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. *Animal Reproduction Science*, 114(1–3), 183–192.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.007>

Sugiyama, T., Takahashi, K., & Mori, H. (2012). Royal Jelly Acid, 10-Hydroxy-trans-2-Decenoic Acid, as a Modulator of the Innate Immune Responses. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 12(4), 368–376.

<https://doi.org/10.2174/187153012803832530>

- Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B., O'Neill, S., & McElvaney, N. G. (2003). Inactivation of Human β -Defensins 2 and 3 by Elastolytic Cathepsins. *The Journal of Immunology*, *171*(2), 931–937.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.931>
- Tsiligianni, T., Karagiannidis, A., Roubies, N., Saratsis, P., & Brikas, P. (2002). Concentration of calcium, zinc, magnesium, potassium and sodium in the bovine cervical mucus during normal oestrus and oestrus induced by progesterone and/or PGF2 α . *Reproduction, Fertility and Development*, *14*, 427–431.
- Valencia, J. (2018). Pubertad y estacionalidad reproductiva. In L. Rangel & J. Hernández (Eds.), *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (1^a edición, pp. 107–114). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Whitley, N. C., & Jackson, D. J. (2003). An update on estrus synchronization in goats : A minor species 1. *Assisted Reproduction in Goats*, 270–276. College Park.
- Wildeus, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*, *77*(E-Suppl), 1.
<https://doi.org/10.2527/jas2000.00218812007700ES0040x>
- Yamaga, M., Tani, H., Yamaki, A., Tatefuji, T., & Hashimoto, K. (2019). Metabolism and pharmacokinetics of medium chain fatty acids after oral administration of royal jelly to healthy subjects. *RSC Advances*, *9*(27), 15392–15401.
<https://doi.org/10.1039/c9ra02991e>
- Zarco, L. (2018). Manipulación del ciclo estral. In L. Rangel & J. Hernández (Eds.),

Fisiología reproductiva de los animales domésticos (1ª Edición, pp. 317–345).

Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México- Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia.