



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Determinación de la presencia de una isoforma proteica de la hormona foliculoestimulante (FSH) en la jalea real de abejas *Apis mellifera* mediante las técnicas de fenol básico, separación de proteínas por 2D y espectrometría de masas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

LUIS EDUARDO ARGUETA LÓPEZ

A S E S O R E S :

MVZ PhD Hilda Morayma Guerrero Netro

MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez



Ciudad Universitaria, Cd. de México 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Determinación de la presencia de una isoforma proteica de la hormona foliculoestimulante (FSH) en la jalea real de abejas *Apis mellifera* mediante las técnicas de fenol básico, separación de proteínas por 2D y espectrometría de masas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUIS EDUARDO ARGUETA LÓPEZ

ASESORES:

MVZ PhD Hilda Morayma Guerrero Netro

MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez



Ciudad Universitaria, Cd. de México 2023

“Si tener un alma significa ser capaz de sentir el amor y la lealtad y gratitud, entonces los animales están mejor que muchos de los seres humanos.”

-James Herriot, All creatures great and small.

DEDICATORIA

Con todo mi amor para mi familia.

Para cada animalito que me brindo la oportunidad de aprender y formarme como lo que soy ahora.

“Podemos juzgar el progreso por la valentía de las preguntas y la profundidad de las respuestas; por la osadía de encontrar la verdad más que en regocijarnos en lo que nos hace sentir bien.”

-Carl Sagan.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, la **MVZ PhD Hilda Morayma Guerrero Netro** por abrirme las puertas a su grupo de trabajo, por compartirme su enorme conocimiento y experiencia, por mostrarme que mi pasión está en el laboratorio y en la ciencia. Al **MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez** por su paciencia y su confianza, por compartirme tantas experiencias y tantos conocimientos para mi formación como médico veterinario y como persona.

A mi **Jurado**, por invertir su valioso tiempo para mejorar este trabajo y por compartir su conocimiento.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por ser mi alma máter.

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por formarme como profesionalista y como ser humano.

A la **Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII)**, al **Dr. Jorge Herrera Díaz** por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en sus instalaciones y por la asesoría recibida.

A mi Madre **Yolanda López**, que siempre ha confiado en sus hijos y que cada vez que nos perdemos en el camino nos ayuda a levantarnos y seguir caminado.

A mi Padre **José Luis Argueta**, por ser mi más grande apoyo, tu dedicación y amor por tu familia es mi ejemplo para seguir.

A mi Hermana **Belén Argueta**, por toda la ayuda que me ha brindado a lo largo de mi vida académica.

A mis amigas **Claudia, Darinka y Yessica**, por todas las horas de risas, por su compañía durante esta aventura, por apoyarme incondicionalmente académica y personalmente.

A **Jocelyn Torres**, por que tu presencia en mi vida me convirtió en una mejor persona y sin tí, yo no estaría aquí.

A mis mascotas **Conga, Manchas, Trapo y Luneta** por todo el amor que brindan.

RESUMEN

ARGUETA LÓPEZ LUIS EDUARDO. Determinación de la presencia de una isoforma proteica de la hormona foliculoestimulante (FSH) en la jalea real de abejas *Apis mellifera* mediante las técnicas de fenol básico, separación de proteínas por 2D y espectrometría de masas. (Bajo la dirección de la MVZ PhD Hilda Morayma Guerrero Netro y el MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez).

El presente trabajo fue realizado con el fin determinar la presencia de una isoforma proteica en la jalea real de *Apis mellifera* con una estructura similar a la hormona folículo estimulante (FSH).

El estudio se realizó con jalea real procedente de colmenas ubicadas en Xochimilco, CDMX. La jalea se sometió a los procesos de extracción de proteínas y purificación por fenol, junto con un análisis electroforético mediante separación en 1D SDS-PAGE, posteriormente se realizó un análisis del patrón electroforético para determinación de la cantidad de proteínas a partir de su peso molecular y su punto isoelectrico en un 2D SDS-PAGE, seguido de la identificación de todas las proteínas por medio de espectrometría de masas, por último se llevó a cabo la comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con las respectivas secuencias de las subunidades β de FSH de borrega (junto sitio activo), vaca, rata y la hormona eCG para determinar el porcentaje de similitud.

Se obtuvieron un total de 45 proteínas con porcentajes de similitud que rondan entre el 20 y 30% de manera general, siendo la *Major royal jelly protein 2 (MRJP2)* de *Apis mellifera* la proteína con el porcentaje de similitud más alto registrado con apenas un 32.20% comparado con la secuencia del sitio activo de la subunidad β de FSH de la borrega.

Concluimos, con base en las comparaciones de las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con la secuencia de la subunidad β de FSH de distintas especies, podemos decir que ninguna de ellas es significativamente similar estructuralmente a la hormona FSH de mamífero, pero no se descarta que alguna(s) de estas proteínas tengan el mismo efecto que esta hormona ya que en la naturaleza existen casos de proteínas completamente distintas que pueden presentar la misma actividad biológica en un organismo.

CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Revisión de literatura.....	3
2.1 Endocrinología reproductiva.....	3
2.2 Hormona folículo estimulante	5
2.3 Acción de la FSH en los ovarios de mamíferos	7
2.4 Acciones de FSH in vivo e in vitro	7
2.5 Hormona con similar actividad a la FSH.....	8
2.6 Isoformas de FSH	9
2.7 El Género <i>Apis</i>	10
2.8 Hormona juvenil.....	10
2.9 Jalea real.....	10
2.10 Proteínas de la jalea real.....	11
2.11 Jalea real en la reproducción animal	13
3. Hipótesis	15
4. Objetivo general	16
4.1 Objetivos específicos.....	16
5. Material y métodos	16
5.1 Lugar de realización.....	16
5.2 Material.....	16
5.3 Metodología	17
5.3.1 Búsqueda bibliográfica de las características proteómicas de la jalea real y de la hormona folículo estimulante (FSH)	17
5.3.2 Extracción de proteínas de la jalea real y purificación por fenol.....	17
5.3.3 Análisis del patrón electroforético mediante separación en 2D SDS-PAGE	18
5.3.4 Identificación de proteínas por medio de la técnica huella peptídica e identificación por LC-MS	19
5.3.5 Comparación de las secuencias de aminoácidos.....	21
6. Resultados.....	22
6.1 Extracción de proteínas de la jalea real y purificación por fenol, análisis del patrón electroforético mediante separación en 1D SDS-PAGE.....	22
6.2 Análisis del patrón electroforético mediante separación en 2D SDS-PAGE para determinación de la cantidad de proteínas partir de peso molecular y punto isoelectrico	23

6.3	Identificación de proteínas por medio de la técnica huella peptídica e identificación por LC-MS	24
6.4	Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con las respectivas secuencias de las subunidades β de FSH de diferentes mamíferos	26
7.	Discusión.....	30
8.	Conclusión.....	32
9.	Bibliografía	33

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1	5
Figura 2	6
Figura 3	12
Figura 4	22
Figura 5	23
Cuadro 1	13
Cuadro 2	20
Cuadro 3	24
Cuadro 4	25
Cuadro 5	26

1. Introducción

La hormona foliculo estimulante (FSH) es una gonadotropina secretada por la adenohipofisis en mamíferos; las gonadotropinas tienen la función de favorecer la secreción de proteínas, factores de crecimiento y hormonas en las gónadas, asimismo, estimulan la producción de esteroides sexuales como estrógenos, progesterona y testosterona que a su vez regulan la secreción de estas mismas hormonas (Recchia et al., 2021). En el ovario la FSH tiene la función de llevar a cabo el reclutamiento de los folículos y estimular el crecimiento de los mismos (Recchia et al., 2021). Esta gonadotropina juega un papel importante en la expansión de células del *cumulus*, que son las células que rodean al ovocito y juegan un papel muy importante en la maduración de estos, la expansión es uno de los primeros indicadores morfológicos de una maduración exitosa (Salhab et al., 2013).

Estructuralmente la FSH es una glicoproteína heterodimérica de 35,5 kDa compuesta por dos unidades polipeptídicas, denominadas subunidades alfa y beta (Bhartiya et al., 2021). La subunidad alfa comparte su estructura con otras hormonas como son la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), mientras que la subunidad beta varía, es única de cada hormona y de cada especie (Bhartiya et al., 2021). Actualmente la información proteómica y genómica de esta hormona y sus diferencias entre especies está disponible en diferentes bases de datos que se pueden encontrar en internet, una de ellas por ejemplo es [Uniprot.org](https://www.uniprot.org/), en esta página se tienen registradas 15,897 proteínas diferentes relacionadas con la FSH incluyendo las subunidades de esta para diversas especies de animales, en lo que respecta al género *Apis* de las abejas se han registrado 105,039 proteínas que participan en toda una variedad de procesos biológicos.

La jalea real de *Apis mellifera* es un producto de la secreción de las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas nodrizas, tiene la característica de ser un material cremoso y con un pH ácido de color blanco lechoso a amarillento; presenta un sabor y olor ligeramente ácido (Melliou, 2014). Tiene la función de ser un alimento para las larvas por no más de tres días, permitiendo su metamorfosis en abejas obreras y zánganos mientras que para las reinas es el único alimento que consumirá durante toda su vida larval y adulta (Melliou, 2014).

Químicamente la jalea real posee agua, lípidos, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales, esta composición puede variar según las condiciones ecológicas alrededor del lugar donde las abejas pecorean, además, la especie que la produce y la africanización de las abejas son otros factores que pueden alterar las características químicas de este producto (Chuan et al., 2022).

La jalea real posee actividades biológicas, tales como, antioxidante, hipocolesterolemizante, hipotensora y reguladora de la presión arterial, antitumoral, antibiótico, antiinflamatorio, inmunomodulador, antialérgico, antienvjecimiento, etc (Pavel et al., 2011). Todos estos efectos han sido estudiados en modelos *in vitro* e *in vivo* con animales como el ratón, rata, conejo, hámster, oveja, cabra, vacas y aves (Pavel et al., 2011).

Estudios realizados por Mishima y colaboradores en el 2005; demostraron que la jalea real presenta efectos farmacológicos similares a los causados por los estrógenos *in vivo*, *in vitro* observaron que la jalea real compitió con los receptores a estradiol en humanos y estimuló la proliferación de células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama que expresa niveles considerables de receptores a estradiol) una respuesta celular que se sabe que es inducida por estrógenos, mientras que *in vivo* se observó que en ratas con ovariectomía bilateral (OVX) a las que se le aplicó una inyección subcutánea de jalea real, restauraron la expresión del gen VEGF que es un gen sensible a los estrógenos en el útero y el cerebro, los principales órganos diana de esta hormona.

En posteriores investigaciones realizadas por Husein y Haddad en el 2006, demostraron que tras la aplicación de dispositivos liberadores de progesterona intravaginal (CIDR) en ovejas de la raza Awassi, la jalea real ejerció un efecto similar al de una gonadotropina no hipofisiaria: gonadotropina coriónica equina (eCG), esta posee actividad similar a la FSH y lo hizo de manera tan efectiva que mejoró el rendimiento reproductivo de los animales, acortando el tiempo de inicio del estro entre 10 - 12 h y aumentando las tasas de gestación y parto.

Asimismo, Giménez-Díaz y colaboradores en 2012 con razas de ovinos de cola gorda, demostraron que el tratamiento de jalea real con progesterona natural exógena y dosis bajas de gonadotropina coriónica equina (eCG) nuevamente acortó el tiempo de inicio del estro y aumento las tasas de concepción en estos animales.

Veshkini y colaboradores en 2018, comprobaron el aumento de las tasas de maduración de ovocitos de ovejas cuando se cultivan de manera *in vitro* en presencia de jalea real a diferentes concentraciones, además confirman el efecto antioxidante beneficioso de la jalea real en la reducción de la incidencia de apoptosis en los ovocitos durante la maduración.

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* que demostraron que la jalea real puede modificar las concentraciones séricas de progesterona y estradiol en cabras de raza Alpina Francesa en época reproductiva, asimismo se comprobó que la jalea real contiene progesterona, estradiol y testosterona en diferentes concentraciones, hormonas que resultan esenciales para el desarrollo de ovocitos en la mayoría de las especies domésticas. Las hormonas se midieron a través de pruebas de ELISA, realizadas con kits comerciales de la marca DRG, para la detección de progesterona se utilizó un kit con una sensibilidad de 0.045 ng/mL y un coeficiente de

variación máximo de 24.22%, el estradiol fue detectado con un kit con una sensibilidad de 9.714 pg/mL y un coeficiente de variación máximo de 12.23% y finalmente la testosterona fue cuantificada con un kit con una sensibilidad de 0.083 ng/mL, con un coeficiente de variación máximo de 9.50% (Castro-Chavéz, 2019).

Ruiz-Gálvez en 2021, en su tesis de licenciatura demostró que la jalea real funciona como reemplazo del suero fetal bovino (FBS) en la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos, independientemente de la época reproductiva. Esto representa un beneficio económico ya que una comparación entre los precios actuales de los componentes para un medio de maduración muestra que utilizar la jalea real resulta más barato que utilizar FBS (jalea real \$150/10 g, FBS \$3463/100 ml).

Pérez Herrera en 2021 realizó para su tesis de licenciatura un estudio que demuestra que 10 mg/ml de jalea real permite la expansión del complejo *cumulus-ovocito* en bovinos por medio de la activación de la vía de señalización de AMPc-PKA en ausencia de FSH durante la maduración *in vitro*. Con base en este estudio se observa que la jalea real, de igual forma que la FSH, puede activar la vía de señalización AMPc-PKA, permitiendo la transcripción y traducción de anfirregulina (AREG) y epiregulina (EREG) que darán como resultado la expansión de las células del *cumulus*; esta expansión es uno de los primeros indicadores morfológicos de una maduración exitosa del ovocito. Por tales motivos se sugiere que existe la probabilidad de que una proteína de la jalea real de *Apis mellifera* posea la capacidad de activar las mismas rutas de señalización que la FSH. Sin embargo, aún con todos estos antecedentes no se ha demostrado la existencia de esta posible proteína, razón por la cual se propone el presente trabajo.

2. Revisión de literatura

2.1 Endocrinología reproductiva.

La reproducción se rige por una comunicación neuronal y hormonal meticulosa entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, el control de este sistema regulador comienza con la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Smith, 2012). Fig 1. Un tipo de neuronas especializadas ubicadas en el hipotálamo son las encargadas de producir GnRH, la cual es secretada en forma de pulsos hacia la eminencia media, difunde por los capilares del sistema porta-hipofisiario y de ahí a los gonadotropos de la hipófisis anterior, también conocida como adenohipófisis, en donde su función es estimular la producción y secreción de las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), entre otras (Rippe, 2009). Estas dos hormonas son secretadas a la corriente sanguínea por medio de pulsos que varían en frecuencia y amplitud, además, son reguladas por la producción de GnRH por el hipotálamo en un centro cíclico y tónico (Motta Delgado et al., 2011).

La FSH es la responsable de la producción de estrógenos en el ovario, del crecimiento y maduración de los folículos ováricos; la LH está involucrada en el proceso de liberación de progesterona, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Motta Delgado et al., 2011).

Los estrógenos son hormonas esteroideas producidos por los folículos ováricos que tienen influencia sobre los oviductos, el útero, la vagina, la vulva, así como en el sistema nervioso central y el hipotálamo (Motta Delgado et al., 2011). Estos estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo produciendo la liberación de GnRH que a su vez inducirá la liberación del pico preovulatorio de LH en la hipófisis anterior, lo que desencadenará la ovulación (Rippe, 2009).

La progesterona también es una hormona esteroide, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH; es responsable de la preparación del útero para permitir la implantación del embrión y de mantener la gestación, además, tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, inhibiendo la secreción de GnRH (Rippe, 2009).

Otra hormona producida en el ovario es la inhibina, esta es una hormona proteica producida específicamente por las células de la granulosa, es la encargada de regular la secreción de FSH a nivel hipofisario a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Motta Delgado et al., 2011).

En contra parte, la activina es una hormona proteica que puede ser producida por las células de la granulosa, la hipófisis y placenta, actúa como un potente estimulador de la síntesis y secreción de FSH a nivel hipofisario a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, ambas hormonas resultan esenciales en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Andreone, 2014).

En el útero se produce la prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) la cual interviene en la regulación del ciclo estral mediante su efecto de luteólisis o regresión del cuerpo lúteo, además interviene en los procesos de ovulación y parto (Rippe, 2009).

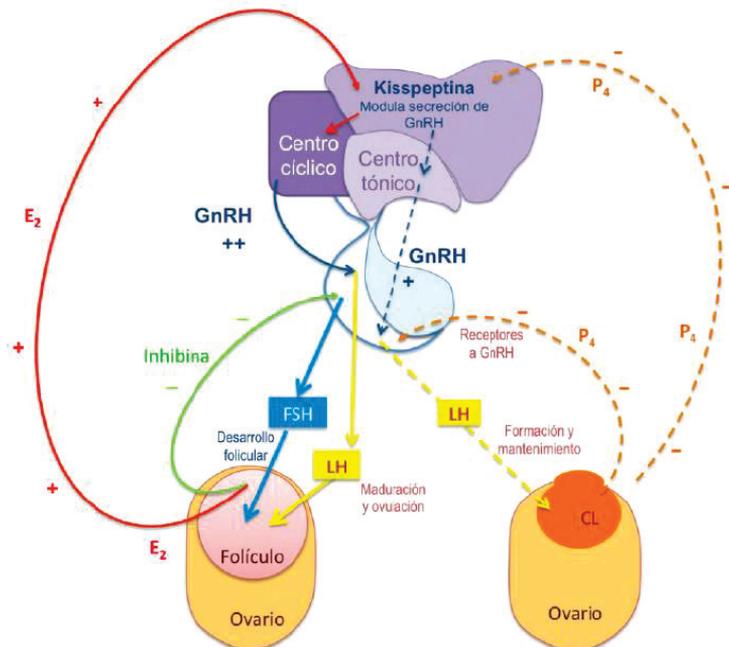


Figura 1. Interacción hormonal del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (Rangel, 2018)

2.2 Hormona folículo estimulante

La hormona estimulante del folículo (FSH) es una glicoproteína secretada por los gonadotropos de la hipófisis y junto con la hormona luteinizante (LH), desempeña un papel central en la reproducción de los mamíferos (Simoni y Casarini, 2014). La FSH actúa directamente sobre las gónadas en ambos sexos, uniéndose a su receptor en la superficie de las células diana, iniciando una cascada de eventos moleculares que comienzan con la activación de vías de señalización específicas (Hansson et al., 2000). Estos eventos incluyen desde la esteroidogénesis hasta la diferenciación celular y la proliferación de los folículos ováricos (Días et al., 2010).

La FSH es una glicoproteína compuesta por dos subunidades polipeptídicas glicosiladas, denominadas α y β , tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa, que varía según la especie y la longitud de los oligosacáridos añadidos (Barrios et al., 2006). La subunidad α es común a otras hormonas glicoproteicas producidas por la hipófisis, por ejemplo, la LH, la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (CG), pero no se ha demostrado ninguna función para esta subunidad de manera libre (Santi et al., 2018); la subunidad β es exclusiva de cada hormona glicosilada y cuando se asocia con la subunidad α le confiere actividad biológica (Berger y Laphorn, 2016).

Es importante mencionar que grupos de carbohidratos presentes en ubicaciones específicas en cada subunidad con dos restos de oligosacáridos que tienen un papel clave en la determinación de una serie de propiedades funcionales de la hormona, incluido el ensamblaje de la subunidad α/β , la afinidad de unión al receptor, la activación del receptor y la señalización intracelular (Barrios et al., 2006).

Los restos de oligosacáridos se acoplan a través de N-acetilglucosamina en grupos específicos de asparagina en las subunidades α y β ; los oligosacáridos contienen los monosacáridos como manosa, galactosa, glucosamina, N -acetilgalactosamina y ácido siálico, además, los oligosacáridos son ramificados y heterogéneamente terminan principalmente en ácido siálico y fucosa (Marshall, 2004). Estas diferencias son en gran parte responsables de la variación del punto isoelectrónico (pI) (4,5 a 5) de esta gonadotropina (Marshall, 2004).

En 2005 se estudió la estructura de FSH humana combinada con su receptor (FSH-R) y se observó que la FSH se une al FSH-R en la cara cóncava del dominio del receptor extracelular curvo, similar a un broche (Fan y Hendrickson, 2005). Fig. 2.

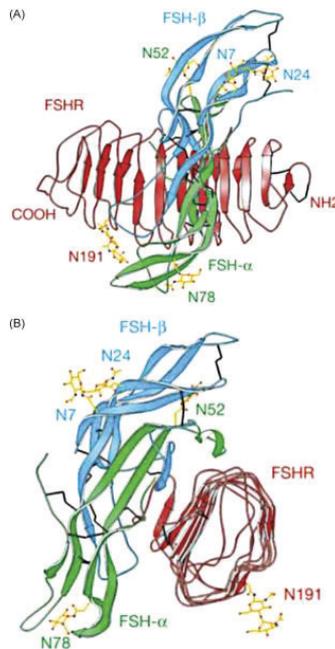


Figura 2. Estructura cristalina de FSH humana unida a FSHR (Fan y Hendrickson, 2005).

2.3 Acción de la FSH en los ovarios de mamíferos

El ciclo ovárico se compone de cuatro fases: fase folicular, ovulación, fase lútea y la luteólisis, la FSH juega un papel importante sólo durante la primera fase de este ciclo (Santi et al., 2018).

La FSH estimula las células de la granulosa para que produzcan la enzima aromatasa, que convierte a los andrógenos producidos por las células de la teca en estradiol; el número de células de la granulosa aumenta por la mitosis que ocurre bajo estímulos proliferativos inducidos por FSH (Santi et al., 2018).

En los folículos en crecimiento, la FSH también aumenta la producción de estradiol y el número de receptores de LH sobre las células de la teca y la granulosa, solo aquellos folículos con suficiente estimulación de gonadotropinas y estrógenos continuarán con el proceso conocido como foliculogénesis (Marshall, 2004).

A medida que el folículo crece, se forma una cavidad alrededor del ovocito de modo que capas de células de la granulosa y líquido lo empiezan a rodear; una vez que se eleva el nivel de estradiol circulante producido por los folículos preovulatorios el estradiol provoca una liberación abrupta de LH y FSH, lo que resulta en la ovulación, es decir, la extrusión del ovocito y las células de la granulosa que lo rodean, una vez que se ha producido la ovulación, el nivel de la FSH disminuye considerablemente y la formación del cuerpo lúteo queda bajo la influencia de la LH (Santi et al., 2018).

2.4 Acciones de FSH *in vivo* e *in vitro*

En vista de los efectos de las gonadotropinas, estas se han utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* para mejorar la capacidad de desarrollo de los ovocitos; aunque su mecanismo de acción molecular permanece mal definido, sus efectos genómicos *in vitro* podrían ser diferentes de los *in vivo*, donde actúan en sinergia y donde están presentes tanto las células de la granulosa como las de la teca rodeando al ovocito (Assidi et al., 2013).

In vitro, se ha demostrado que la FSH mejora la maduración de los ovocitos (tanto nuclear como citoplásmica), la expansión de las células del *cumulus* (CC), la fertilización *in vitro* (FIV) y el desarrollo embrionario temprano en varias especies de mamíferos (Assidi et al., 2013).

In vivo, se ha demostrado que los efectos secuenciales de las gonadotropinas (FSH y LH) y la presencia de otros factores intrafoliculares, son mucho más adecuados para la adquisición ovocitos ya que en el desarrollo folicular apoyado por FSH *in vivo*, las tasas de ovocitos con competencia de desarrollo exitosa esta entre 60 y 80% en el caso de los bovinos, en cambio,

si se recuperan ovocitos de folículos antrales no estimulados (del matadero), este porcentaje desciende a una media del 25 o 45% en condiciones ideales *in vitro* (Blondin et al., 2002).

El mecanismo de acción molecular de la FSH se inicia en el complejo *cumulus-ovocito* (COC) a través del receptor para FSH (FSH-R) en las células de la granulosa y se sabe desde hace décadas que la FSH no tiene ningún efecto sobre los ovocitos desnudos de manera *in vitro* (Assidi et al., 2013).

FSH-R es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) con un dominio específico transmembranal que activa la vía clásica AMPc-PKA en las células de la granulosa la cual finaliza con la transcripción y traducción de anfirregulina (AREG) y epiregulina (EREG) que posteriormente se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) ubicado en la membrana de las células del *cumulus* que dará como resultado la expansión de las células del *cumulus* (Caixeta et al., 2013).

2.5 Hormona con similar actividad a la FSH

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es la hormona que presenta la actividad más similar a la hormona FSH, tiene una participación importante en la reproducción, antiguamente conocida como gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) u hormona luteinizante equina, es una glicoproteína secretada por las células epiteliales trofoblásticas de origen fetal que forman las copas endometriales (Manteca et al., 2019). Está constituida por dos subunidades, las que son sintetizadas y secretadas como cadenas heterodímeras α y β , con pesos moleculares de 44 y 17 kDa respectivamente (Simonetti et al., 2019).

Se cree que la función del eCG en la yegua es promover el desarrollo de los cuerpos lúteos accesorios, lo que ayuda a apoyar el desarrollo del feto (Hoppen, 1994). Esta misma hormona es ampliamente utilizada en otras especies como los bovinos, caprinos, ovinos y porcinos para inducir la liberación tanto de la hormona luteinizante (LH) como de la hormona foliculoestimulante (FSH) (Manteca et al., 2019), ya que en especies diferentes a los equinos puede unirse a ambos receptores de estas gonadotropinas, pero tiene particularidad especial de unión al receptor de FSH, está la base para doble actividad de la eCG, ya que su estructura primaria permite su interacción con este receptor y su efecto se ve reforzado por la larga vida media de esta hormona de 4 a 6 días, estimulando la secreción de estradiol y progesterona (Moore y Ward, 1980).

La incorporación de gonadotropinas, como la eCG, que favorezcan el inicio de los eventos preovulatorios es de uso común (López et al., 2021). La administración de eCG estimula el desarrollo de los folículos ováricos de tamaño medio y grande e induce la ovulación del folículo

dominante presente en el momento del tratamiento, siendo un efecto dosis dependiente (mayor respuesta ovárica con dosis elevadas), se ha observado que al aumentar el tamaño del folículo preovulatorio, el cuerpo lúteo que se desarrolla posteriormente es de mayor tamaño, produciéndose una mayor concentración de progesterona; pero la eCG no solo puede aumentar los niveles de progesterona por este mecanismo, sino que si se aplica días después de la ovulación también incrementa dichos niveles hormonales ya que aumenta la capacidad de secreción de las células lúteas (De Rensis y López, 2014).

2.6 Isoformas de FSH

Por definición, las isoformas son diferentes formas de una proteína que puede ser producida a partir de genes diferentes, o por el mismo gen por uniones alternativas; al igual que con otros miembros de la familia de hormonas glicoproteicas, la FSH se produce y libera como una serie de isoformas que difieren entre sí en su estructura de oligosacáridos (Barrios et al., 2006). Además, estas isoformas también difieren en su capacidad para provocar una variedad de respuestas biológicas *in vitro* e *in vivo* (Barrios et al., 2006).

Como se mencionó antes, esta hormona presenta oligosacáridos unidos a ella que terminan en ácido siálico y fucosa (Marshall, 2004). Esto permite formar una variedad de isoformas que difieren en sus puntos isoeléctricos (pI) debido a la variación en el grado y tipo de glicosilación en las subunidades α y β (Butler et al., 2008).

El punto isoeléctrico (pI) de la FSH tiene un amplio rango dependiendo de la abundancia de residuos de ácido siálico, las isoformas fuertemente sialiladas tienen un pH ácido y las isoformas con poco o nada de ácido siálico tienen un pH menos ácido o básico (Butler et al., 2008).

Las isoformas menos ácidas tienen mayor bioactividad *in vitro* que las isoformas más ácidas, pero las isoformas menos ácidas se eliminan más rápidamente de la circulación, por lo tanto, tienen una bioactividad *in vivo* más baja que las isoformas más ácidas (West et al. 2002).

Las isoformas de FSH han sido muy estudiadas en humanos, por ejemplo, se ha descubierto que la distribución de estas isoformas en la sangre varía a lo largo del ciclo menstrual y durante la vida de las personas (Anobile et al. 1998). Las concentraciones de estradiol se asociaron con isoformas de FSH menos ácidas durante el ciclo menstrual, además, se descubrió que la pérdida estrogénica en la menopausia da como resultado isoformas ácidas relativamente simples (Anobile et al. 1998).

Dado que la hormona eCG cumple funciones biológicas similares a la FSH y LH, siendo predominante la función de la FSH para estimular el desarrollo de los folículos gracias a que su estructura primaria le permite interactuar con el receptor para de FSH (FSH-R) (Moore y Ward,

1980) podríamos pensar que estas dos hormonas son isoformas, pero Combarrous en 1988 determinó que la similitud entre estas dos hormonas es de tan solo 18-45% dependiendo de las especies con la que se compare, porcentajes muy bajos en comparación con las isoformas conocidas de FSH de ovino que presentan porcentajes de más de 90% de similitud según el sitio web especializado en proteínas Uniprot.org.

2.7 El Género *Apis*

Las abejas melíferas (género *Apis*) son insectos sociales de la familia *Apidae*, del orden *Hymenoptera* y están entre los *Aculeata* (los que tienen agujones), evolucionaron después de la separación de las Américas y Australia de Eurasia/África y son nativas solo del viejo mundo (Crane, 2009). El género *Apis* probablemente apareció por primera vez en el Eoceno, hace unos 55 millones de años (Crane, 2009).

El género *Apis* contiene 11 especies conocidas, *A. mellifera* es nativa de toda África, Oriente Medio y Europa, excepto en las regiones del extremo norte, es la especie más importante para los humanos ya que se ha introducido en todo el mundo para su uso en la apicultura y es la mayor fuente de miel del mundo (Crane, 2009).

2.8 Hormona juvenil

La hormona juvenil es un sesquiterpenoide (terpeno de 15 carbonos y derivado de tres isoprenos) que se encuentra presente en todas las ninfas y larvas de los insectos (Villalobos et al., 2010).

Esta hormona en las etapas preadultas, regula los procesos de desarrollo y crecimiento, mientras que en las hembras adultas induce la vitelogénesis (la producción de la principal proteína de la yema de los huevos), sin embargo, mientras que el papel de la hormona juvenil en el desarrollo parece estar ampliamente conservado en todas las especies de insectos, su papel en la reproducción ha estado sujeto a muchas modificaciones; en algunos insectos altamente eusociales como *Apis mellifera* ya no actúa como una gonadotropina, sino que regula la maduración y la división del trabajo en las abejas obreras (Nijhout y Wheeler, 1982).

2.9 Jalea real

La jalea real es un producto de la secreción de las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas nodrizas, tiene la característica de ser un material cremoso, con un pH ácido de color blanco lechoso a amarillento, presenta un sabor y olor ligeramente ácido (Melliou, 2014).

Todas las larvas dentro de los tres días posteriores a la eclosión son alimentadas con jalea real por abejas nodrizas, después de los primeros tres días de desarrollo larvario, las larvas designadas como reinas continúan siendo alimentadas con jalea real durante todo su desarrollo, mientras que las designadas como obreras se someten a una dieta compuesta por una mezcla de la secreción mandibular de las abejas nodrizas, miel y polen (Scarselli et al., 2005).

La dieta de larvas jóvenes de abejas mellíferas destinadas a ser reinas es de jalea real o alimento a base de polen, este consumo determina los eventos moleculares de la diferenciación celular en reinas u obreras (Scarselli et al., 2005). Una larva reina consume aproximadamente un 25% más de alimento que una larva obrera y su peso puede aumentar hasta 1300 veces en 6 días (Crane, 2009).

Químicamente la jalea real posee agua, lípidos, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales, esta composición puede variar según las condiciones ecológicas alrededor del lugar donde las abejas pecorean; la especie y la africanización son factores que pueden alterar las características químicas de este producto (Chuan et al., 2022) además, la secreción de jalea por parte de las glándulas también cambia en composición según la edad de las abejas nodrizas (Huo et al., 2016).

Varios estudios previos han demostrado que la jalea real puede exhibir efectos similares a los estrógenos *in vitro* e *in vivo* (Mishima et al., 2005). Cuatro ácidos grasos presentes en la jalea real: ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico, ácido 10-hidroxidecanoico, ácido trans-2-decenoico y el 24-metilcolesterol presentan actividad estrogénica (Liu et al., 2020).

Con estos componentes nutricionales y funcionales la jalea real exhibe una amplia variedad de propiedades farmacológicas, como efectos antioxidantes, hipocolesterolemiante, hipotensores y reguladores de la presión arterial, efectos antitumorales, antibiótico, antiinflamatorio, inmunomoduladores, antialérgico, antienvjecimiento, etc. (Pavel et al., 2011). Por todas estas acciones, la jalea real está atrayendo un creciente interés público para la prevención de enfermedades y la promoción de la salud (Chuan et al., 2022).

2.10 Proteínas de la jalea real

Como se mencionó anteriormente, la jalea real es producida por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas, pero solo las glándulas hipofaríngeas están involucradas en la producción de proteínas (Ramanathan et al., 2018).

La tasa de síntesis de proteínas en las glándulas hipofaríngeas es más alta en las abejas nodrizas y más baja en las forrajeras (Knecht y Kaatz, 1990), ya que cuando las abejas se vuelven recolectoras, estas glándulas se encogen y detienen la expresión enzimática necesaria para la producción de miel y jalea real (Suwannapong et al., 2010).

Esto es importante ya que nos demuestra que la composición de la jalea real es rica en proteínas cuando las abejas obreras están en la etapa de nodriza joven en comparación a la jalea real producida por abejas forrajeras la cual tiene menor cantidad de proteínas (Ramanathan et al., 2018).

Más del 80% de las proteínas de la jalea, pertenecen a un grupo llamado “Major royal jelly proteins” (MRJP) (Schmitzova et al., 1998). Se cree que las MRJP son el principal factor fisiológico específico en el desarrollo de la abeja reina (Schmitzova et al., 1998).

En diversas investigaciones se han informado hasta nueve miembros de las MRJP codificadas por nueve genes distintos; las cuales, se nombran con base al peso molecular o simplemente se enumeran según el orden en que se descubrieron (Ramanathan et al., 2018).

La familia de MRJP, son proteínas complejas que contienen altas cantidades de aminoácidos necesarios (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina); los cuales son necesarios para nutrir tanto a la abeja reina como a las larvas (Ramanathan et al., 2018).

Se conoce que la MRJP 1 es una glicoproteína débilmente ácida (ph 4.9–6.3, 55 kDa) y forma un oligómero que se estima en 350 o 420 kDa (Kimura et al., 2003); siendo la proteína más estudiada y es considerada como el factor clave que dirige el desarrollo de la abeja reina (Kamakura, 2011). Mientras que MRJP 2, MRJP 3, MRJP 4 y MRJP 5 son glicoproteínas de 49 kDa, 60-70 kDa, 60 kDa y 80 kDa, respectivamente (Schmitzova et al., 1998) y presentan diversas actividades biológicas multifactoriales debido al patrón complejo de compuestos bioactivos que contienen cada una de ellas (Mureşan et al., 2022). Fig. 3.

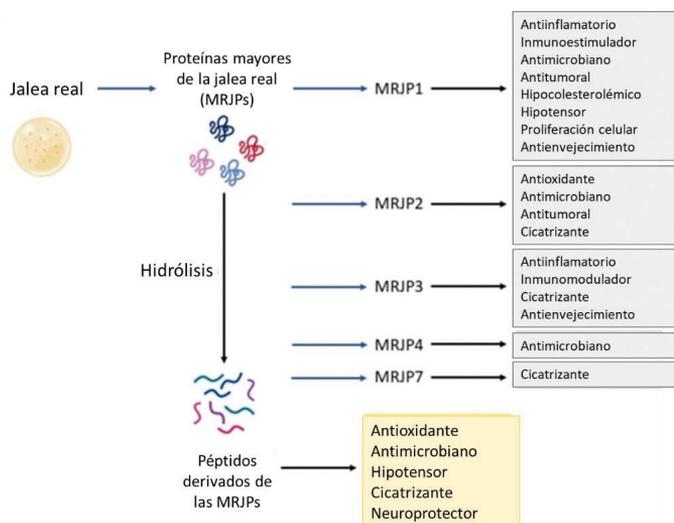


Figura 3. Actividades biológicas de las principales proteínas de la jalea real (MRJP) y sus péptidos derivados, modificado de Mureşan et al., 2022.

Las nueve MRJP se identificaron mediante espectrometría de masas (Schönleben et al., 2007) siendo MRJP 1 el más abundante con un 31-66 % del total de proteínas, seguido de MRJP 5, MRJP 3 y MRJP 4 (Schmitzova et al., 1998). Cuadro 1.

Proteína	Número de aminoácidos	MW teórico (kDa)	pI
MRJP1	413	46.86	5.03
MRJP2	435	49.15	6.65
MRJP3	524	59.49	6.50
MRJP4	444	50.67	5.74
MRJP5	578	68.13	5.95
MRJP6	417	47.58	6.01
MRJP7	426	48.66	4.85
MRJP9	400	45.06	5.81
MRJP9	403	46.27	8.62

Cuadro 1. Principales propiedades de las proteínas de la jalea real (MRJP), MW: peso molecular, pI: punto isoeléctrico (Mureşan et al., 2022).

2.11 Jalea real en la reproducción animal

En los últimos años la jalea real ha sido ampliamente utilizada en investigación con el objetivo de favorecer la reproducción en distintos animales domésticos, por ejemplo, Husein y Haddad en el 2006, demostraron que la aplicación de jalea real por vía intramuscular en ovejas de la raza Awassi, sincronizadas con dispositivos liberadores de progesterona intravaginal (CIDR), ejerció un efecto similar al de la gonadotropina coriónica equina (eCG).

Elnagar en 2010, demostró que la administración por vía oral de jalea real a conejos machos estresados por el calor puede contrarrestar la “infertilidad de verano”, al elevar los niveles de testosterona en la sangre además de aumentar el volumen del eyaculado, la fructosa seminal, la motilidad del espermática y disminuir la producción anormal de espermatozoides y la concentración de espermatozoides muertos.

Giménez-Díaz y colaboradores en 2012 demostraron que la administración de jalea real y eCG por vía intramuscular en razas de ovinos de cola gorda, inducidas con esponjas intravaginales impregnadas de progesterona natural, mejora las tasas de concepción en ovejas inseminadas por vía laparoscópica durante la época de anestro.

Shahzad y colaboradores en 2016, demostraron que agregar jalea real en el diluyente de congelación mejora los parámetros estructurales y funcionales del semen del toro búfalo después de su criopreservación, proporcionando una mejora en la calidad espermática.

Veshkini y colaboradores en 2018, comprobaron el aumento de las tasas de maduración de ovocitos de ovejas cuando se cultivan de manera *in vitro* en presencia de jalea real.

Castro-Chávez en 2019, concluyó que la administración de esponjas intravaginales impregnadas de jalea real para sincronizar el estro en cabras primíparas de la raza Alpino-francesa durante la época reproductiva, es tan efectiva como un tratamiento corto convencional de sincronización con CIDR, manteniendo niveles supralúteos de progesterona necesarios para sincronizar el estro.

Ruiz-Gálvez en 2021, demostró a través de diferentes protocolos de maduración *in vitro* (IVM) que la jalea real funciona como un reemplazo del suero fetal bovino (FBS) en el medio de maduración de ovocitos de ovinos, independientemente de la época reproductiva, además, encontró que la jalea real tiene una mejor tasa de éxito sobre el FBS en la IVM realizada durante el anestro estacional.

Pérez-Herrera en 2021, demostró que 10 mg/ml de jalea real permite la expansión del complejo *cumulus-ovocito* en bovinos en ausencia de FSH durante la maduración *in vitro*.

Con base a lo anterior, aun con todos estos antecedentes, no existe en la literatura información que demuestre la existencia de una proteína similar a la FSH en la jalea real.

3. Hipótesis

La jalea real de *Apis mellifera* presenta una isoforma proteica con una estructura similar a la hormona folículo estimulante (FSH) de mamíferos.

4. Objetivo general

Determinar la presencia de una isoforma proteica en jalea real de *Apis mellifera* con una estructura similar a la hormona folículo estimulante (FSH) de mamíferos.

4.1 Objetivos específicos

-Obtener el componente proteico de la jalea real para separar las proteínas con base en su peso molecular.

-Obtener la información estructural y la secuencia de aminoácidos que forman cada una de las proteínas que componen a la jalea real para compararlas con la estructura y secuencia de aminoácidos de la hormona FSH de mamíferos.

5. Material y métodos

5.1 Lugar de realización

El presente trabajo se realizó en el edificio Mario Molina de la Facultad de Química de la UNAM en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), que está localizado en circuito Mario de la Cueva S/N, Coyoacán, C.U., 04510 Ciudad de México, CDMX.

También se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en el departamento de Reproducción Animal, que está localizado en Av. Universidad #3000, Colonia, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX.

5.2 Material

Un frasco de 8.5 g de jalea real de abeja *Apis mellifera* cosechada en temporada de floración de Chayotillo (*Sicyos deppei*) de colmenas alimentadas con jarabe y sin suplemento durante el mes de octubre del año 2022, de las cuales se realizó un pool; las colmenas están ubicadas en la alcaldía de Xochimilco, CDMX.

5.3 Metodología

5.3.1 Búsqueda bibliográfica de las características proteómicas de la jalea real y de la hormona folículo estimulante (FSH)

Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes sitios web académicos como [Sciencedirect](#), [Wiley](#), [Pubmed](#), etc. sobre estudios que se han realizado utilizando jalea real de *Apis mellifera* en donde se hayan llevado a cabo las técnicas de extracción, cuantificación y determinación de proteínas.

Esto con el objetivo de ampliar los conocimientos y el panorama sobre la realización de las técnicas a realizar, además de descubrir, comparar y discutir las características proteómicas de la jalea real con base en los resultados que se obtengan con la muestra de jalea obtenida.

En cuanto a la hormona FSH, la búsqueda bibliográfica se basó en conocer las distintas secuencias de aminoácidos que componen las subunidades β de distintas especies de mamíferos utilizados comúnmente en la producción animal, como es el caso de los pequeños rumiantes, bovinos, caballos y ratas, dicha búsqueda se realizó en el sitio web de [Uniprot.org](#).

5.3.2 Extracción de proteínas de la jalea real y purificación por fenol

Se tomó un gramo de jalea real y se maceró utilizando un politrón, la muestra se puso en 6 ml de fenol pH 8.8 y se agregó 5 ml de buffer de extracción (100mM tris HCl, pH 8.8, 10mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamercaptoetanol) se aplicaron 5 pulsos de 1 min en el politrón alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos se mantuvo en hielo 10 min más y se centrifugo a 4000 rpm durante 30 min, se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo de 50 ml nuevo y se agregaron 25 ml de acetato de amonio 100 mM en metanol se agitó y se dejó reposar 16 hrs a -20C. Posteriormente se centrifugo a 4000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 5 ml de acetato de amonio en metanol 2 veces y se centrifugo a 4000 rpm por 10 min después de cada lavado, posteriormente se lavó de igual manera la pastilla con acetona al 80% 2 veces y un último lavado con etanol al 70%, la pastilla se resuspendió en 700 μ l de buffer IEF; posteriormente se analizó la integridad de la proteína en un gel de SDS-PAGE 1D.

Se tomaron 4 μ l de la muestra y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida de una dimensión con un estándar de marcador molecular Precision Plus de Biorad como referencia de peso molecular y 1 μ g de Lisozima Sigma #L6876-1G como referencia de cantidad. Se corrió en un gel de poli(acrilamida) al 12% a 120V por 1.20 hrs, posteriormente se desmontó el gel y con mucho cuidado se colocó en solución de coomassie coloidal.

Finalizada la electroforesis, se realizó un primer paso de fijación, incubando los geles en una solución 50 % v/v metanol/agua durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se retira la solución de fijación y se incuban los geles en solución de tinción (8 % p/v sulfato amónico, 2 % ácido fosfórico y 20 % etanol y 0.08 % de Azul de Coomassie G-250) durante, al menos, 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñen los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de bandas.

Se procedió a la adquisición de la imagen para su análisis densitométrico, en un sistema de densitómetro calibrado GS-900 Biorad.

5.3.3 Análisis del patrón electroforético mediante separación en 2D SDS-PAGE.

Se utilizaron 350 µg de la muestra que se resuspendió en 215 µl de buffer desnaturalizante (8M urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 2% tritón X 100 y 50 mM DTT) y se aplicó en una tira de gel de poliacrilamida de 11cm con un gradiente inmovilizador de pH (IPG BIORAD) de un rango de 3-10 durante 10 minutos, a temperatura ambiente, en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, BIORAD).

Posteriormente las tiras fueron cubiertas con aceite mineral y la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque PROTEAN i12 IEF Cell (BioRad) para rehidratarlas activamente (12 h, a 20 C) seguida de 5 pasos de focalización: 250 V por 30 min (rápida), 10000 V por 2h (gradiente), 10000 V (rápida), y 1000V mantenido, hasta un voltaje acumulado de 45-47 kWh.

Tras el isoelectroenfoque, la tira IPG fue removida de la charola, se eliminó el aceite mineral y se incubó con un tampón de equilibrio SDS (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5% p/v SDS 2% DTT). La tira se incubó en esta solución durante 15 minutos en agitación y a temperatura ambiente se repitió la incubación 2 veces, posteriormente se incubó con un tampón de alquilación SDS (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol y 5% p/v SDS 2.5% Iodoacetamida) durante 15 minutos en agitación y a temperatura ambiente, se repitió la incubación 2 veces más, posteriormente se dio un breve lavado con amortiguador de corrida de proteínas SDS 1X. Así las tiras quedaron listas para llevar a cabo la segunda dimensión.

Para la de tira de 11 cm se utilizó el sistema de electroforesis SE600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE), empleando un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12% de 16 x 15 cm.

Para elaborar el gel de acrilamida se prepararon tres soluciones: la primera es una solución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0.8% (p/v) en agua bidestilada. La segunda es una solución de Tris-HCl 1.5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la primera para obtener la concentración del gel de resolución, cuya función es separar a las proteínas por peso molecular. La tercera es una solución de 0.5 M Tris-HCl,

pH 6.8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la primera para obtener el gel concentrador, cuya función es concentrar rápidamente las proteínas que vienen de las tiras IPG. Se añaden también 0.05% APS y 0.005% TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización.

Las soluciones se transfirieron a la cámara de polimerización del sistema SE600 VERTICAL UNIT (GE-HEALTHCARE), la tira IPG se colocó sobre la superficie del gel, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal base.

Para fijar el gel y evitar pérdida de proteínas cuando éstas migran de la tira al gel, se añadió una solución de agarosa 0,5% (p/v) en tampón de corrida SDS-PAGE y con trazas de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 25°C con un voltaje constante de 50 V por 22 horas a temperatura ambiente en un tampón de corrida SDS-PAGE.

Tinción con Coomassie coloidal

Finalizada la electroforesis, se incuban los geles en solución de tinción (8 % p/v sulfato amónico, 2 % ácido fosfórico y 20 % etanol y 0.08 % de Azul de Coomassie G-250) durante, al menos, 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñeron los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de manchas.

Se procedió a la adquisición de la imagen para su análisis densitométrico, en un sistema de densitómetro calibrado GS-900 Biorad.

5.3.4 Identificación de proteínas por medio de la técnica huella peptídica e identificación por LC-MS.

Se realizó un gel SDS-PAGE 1D, con el mismo procedimiento descrito anteriormente, se cortaron las bandas de gel en fragmentos pequeños y se destiñeron con metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) en una proporción 1:1 por 12 horas.

Posteriormente se lavaron con agua destilada y se incubaron en una solución de bicarbonato de amonio 100 mM durante 15 minutos (dos veces), Se redujeron con ditioneitol al 50 mM durante 45 minutos y se alquilaron con iodoacetamida al 30 mM durante 2 horas. Posteriormente se lavaron tres veces con bicarbonato de amonio 100 mM y se deshidrataron completamente con acetonitrilo al 100% y se llevaron a sequedad total.

La digestión de proteínas de los fragmentos de gel se llevó a cabo por incubación de estos con 30 µL de tripsina de porcino modificada, a una concentración de 20 ng/µL durante 18 horas a 37 °C.

Los péptidos de la digestión anterior se extrajeron con acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido fórmico al 5% (v/v) mediante sonicación, después se llevaron a sequedad total, se disolvieron de nuevo e 10 µL de ácido fórmico al 1% (v/v), se desalaron y concentraron por Ziptip C18 y se eluyeron con 30 µL de fase móvil de HPLC (agua-acetonitrilo 97:3 + 0.1% de ácido fórmico) y se colocaron en un inserto.

Los péptidos se introdujeron en el espectrómetro de masas para su análisis por medio de la técnica de “shotgun”, las características del espectrómetro de masas se muestran en el Cuadro 2.

Equipo utilizado	Espectrómetro de Masas Modelo Synapt G2S, Marca WATER, con tiempo de vuelo.
Disolventes y reactivos	Agua grado LC-MS (Marca J.T Baker, lote 0000183615). Acetonitrilo grado LC-MS (Marca J.T Baker, lote 0000171727). Ácido Fórmico grado reactivo analítico (Marca J.T Baker, lote 0000014851). [Glu1]-Fibrinopéptido B, lote W18071815, marca ERA. Waters MassPREPTM E. coli Digest Standar, lote No. W20021711.
Introducción de la muestra	Cromatógrafo de Líquidos Modelo nanoACQUITY, Marca WATERS.
Columna	nanoACQUITY ULPC 1.8 µm, HSST3 C18, 75 µm x 150 mm. S/N: 01973716416209
Precolumna (Trap column)	2G nanoAcquity UPLC Trap Column 5 µm 180 µm x 20 mm. S/N 03073720616583.
Temperatura de columna	35 °C.
Fase Móvil	Fase A: Ac. fórmico al 0.1% en agua. Fase B: Ac. fórmico al 0.1% en acetonitrilo.
Velocidad de flujo de la fase móvil	0.4 µL/min.
Gradiente cromatográfico	00.0 min 7%B. 54.67 min 40%B. 56.33 min 85%B. 59.64 min 85%B. 61.30 min 7%B.
Modo de ionización	Electrospray.
Temperatura de cámara de ionización	70 °C.
Voltaje del capilar	3.00 kV.
Voltaje del cono	30 V.
Intervalo de masas	50-2000 Da.
Lock Mass	[Glu1]-Fibrinopéptido B.
Muestra control	<i>E. coli</i> 100 fmol/ µL.
Rampa de energía de colisión en la trampa	15 – 45 V.
Velocidad de escaneo	1 s.
Detección de iones	Positivos.
Resolución	20,000.

Cuadro 2. Especificaciones del espectrómetro de masas

El software utilizado para el procesamiento de los datos fue Protein Lynx Global Server 2.5.1™; Waters (PLGS). Para la identificación de las proteínas se usó la base de datos extraída de la página web: Uniprot.org para el género *Apis*.

Todas las técnicas mencionadas se llevaron a cabo de acuerdo con lo descrito por Salgado-Albarrán y colaboradores en el 2015, con las modificaciones pertinentes para la jalea real y se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) en el laboratorio de proteómica y biología molecular bajo la supervisión del biólogo encargado.

5.3.5 Comparación de las secuencias de aminoácidos

Una vez que se obtuvieron los resultados de la espectrometría de masas, se realizó de manera individual la comparación de las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas obtenidas con las secuencias de las subunidades β de la hormona FSH de borrega (junto sitio activo), de la vaca y la rata, además se compararon las secuencias con la eCG por su actividad comprobada como FSH fuera de los equinos.

Para la comparación se utilizó el sitio web de Uniprot.org con su función de "Align" que funciona con el programa Clustal Omega, el procedimiento se basó en seleccionar y copiar las secuencias de las proteínas obtenidas y las secuencias subunidades β en su formato FASTA para posteriormente pegar cada una de las secuencias en la matriz de la función Align y ejecutar el programa.

Pasados unos segundos el programa indica el porcentaje de similitud que existe entre ambas secuencias introducidas, este porcentaje incluye a todos aquellos aminoácidos que son idénticos en posición, además, incluye a aquellos aminoácidos que son sinónimos (función similar, pero diferente estructura o estructura similar, pero diferente función).

6. Resultados

6.1. Extracción de proteínas de la jalea real y purificación por fenol, análisis del patrón electroforético mediante separación en 1D SDS-PAGE

Determinación de la integridad de las proteínas contenidas en la muestra de jalea real de *Apis mellifera* mediante una electroforesis de poliacrilamida 1D SDS-PAGE. Se aplicaron 4 μ l de la muestra en el siguiente orden: en el Carril 1, marcador molecular. Carril 2 y 3, muestra de jalea real. Carril 4, 1 μ g de Lisozima pura como referente de carga y cantidad de proteína. Se puede observar en la siguiente imagen el patrón de bandas de la muestra. Fig. 4.

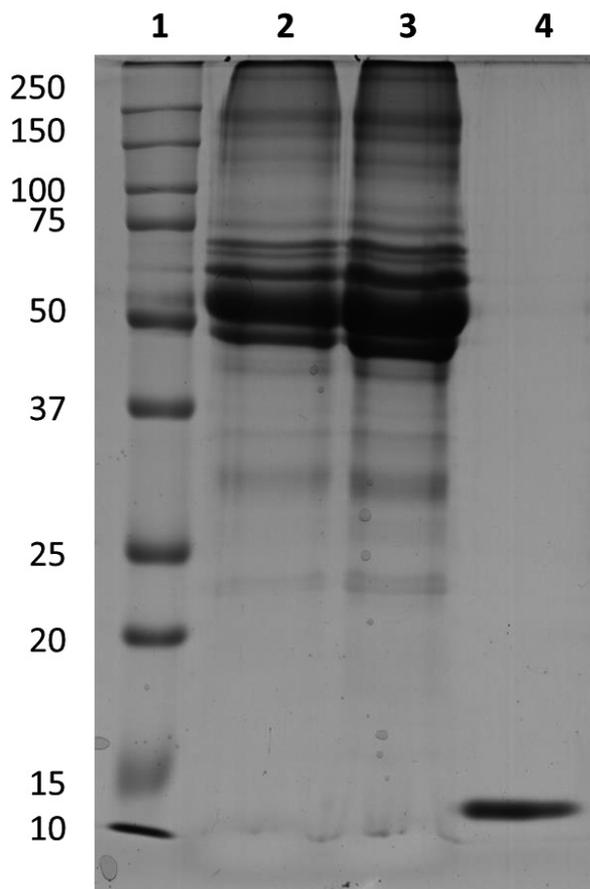


Figura 4. Patrón electroforético de las proteínas contenidas en la jalea real.

Se observa el patrón electroforético de las proteínas contenidas en las muestras una vez limpias y concentradas por el procedimiento utilizado, donde se puede apreciar una distribución de proteínas de pesos moleculares (mr) desde los 25 kDa hasta una gran mayoría de proteínas de 50 a 250 kDa.

6.2 Análisis del patrón electroforético mediante separación en 2D SDS-PAGE para determinación de la cantidad de proteínas partir de peso molecular y punto isoeléctrico.

Patrón electroforético en 2D de la muestra de jalea real de *Apis mellifera*. Fig. 5. En la figura se muestra el patrón 2D bien resuelto en el rango de puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas de pH de 3-10, así como por peso molecular (mr) que va desde los 20 kDa hasta los 250 kDa.

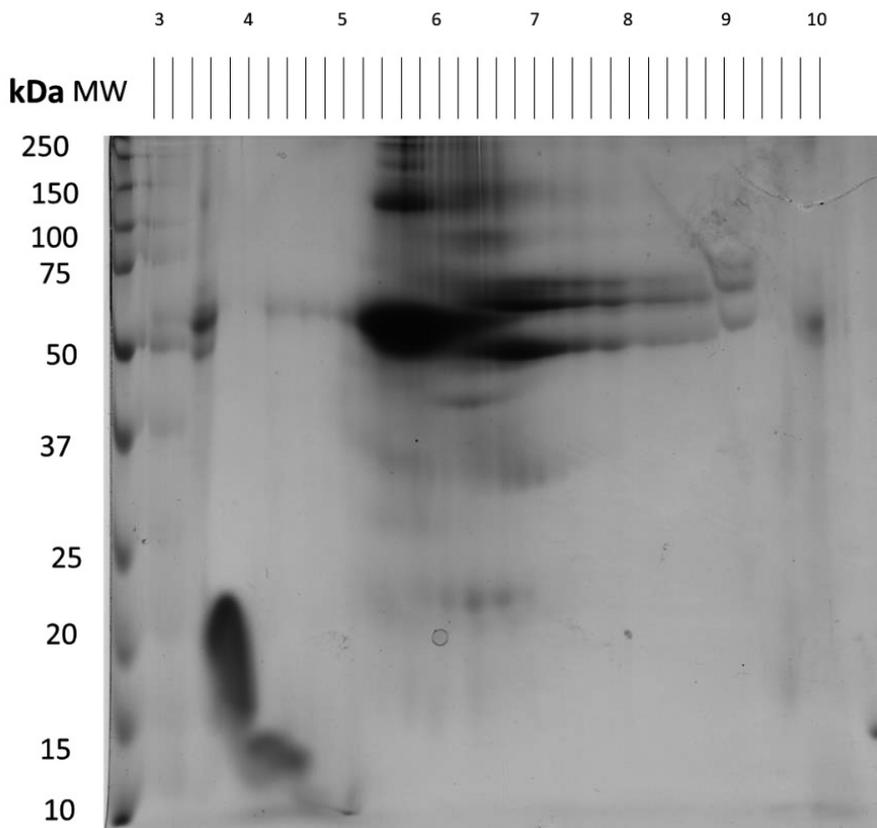


Figura 5. Patrón electroforético en 2D de la muestra de jalea real.

6.3 Identificación de proteínas por medio de la técnica huella peptídica e identificación por LC-MS.

El resultado de la identificación de las proteínas se anexa en las siguientes páginas.

Cuadro 3 y 4.

OK	Entrada	Descripción	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Puntaje	Péptidos	Péptidos teóricos	Cobertura (%)	Péptidos digeridos	Péptidos modificados	ID proteína
2	MRJP1_APIME	Mayor royal jelly protein 1 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP1 PE 1 SV 1	48855	4.9351	32293	149	28	69.213	36	8	34
2	Q8MMJ1_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJO1 PE 2 SV 2	48938	5.4053	25255	61	29	40.4157	23	1	78155
2	Q5VLE2_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 94128 PE 2 SV 1	49014	5.4053	19472	56	29	30.9469	19	1	78013
2	Q3L632_APICA	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera carnica</i> OX 88217 GN mrjp3 PE 3 SV 1	65655	6.9463	12618	109	32	57.6857	40	9	77974
2	A0A7M7MQ90_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406091 PE 3 SV 1	51099	6.646	11625	109	35	73.8938	44	7	20515
2	Q9U8X6_APIME	Glucose oxidase OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406081 PE 2 SV 1	67895	6.4951	892.38	18	35	25.5285	12	2	23027
2	A0A7M7MM52_APIME	Uncharacterized protein LOC413627 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN LOC413627 PE 3 SV 1	72184	5.2372	727.4	13	41	20.0306	8	0	70819

Cuadro 3. Inferencia de proteínas realizada por el espectrómetro de masas organizadas en hits por el programa Protein Lynx Global Server 2.5.1 TM; Waters (PLGS) con un nivel de confiabilidad $\geq 96\%$.

El programa Protein Lynx Global Server 2.5.1 TM de la compañía Waters (PLGS) asignó los péptidos de la jalea real detectados por el espectrómetro de masas en 7 grupos o hits y les dio un calificador (columna de OK en el cuadro 3) que indica el grado de confiabilidad:

- OK 2 = Confiabilidad $\geq 96\%$.
- OK 1 = Confiabilidad $\sim 85\%$.
- OK 0 = Confiabilidad $\leq 85\%$.

La inferencia de proteínas revela que aquellas con mayor cobertura en la jalea real de *Apis mellifera* son la *Bee milk protein OS 7460 GN 406091* de *Apis mellifera* con un 73.89%, seguida de la *Major royal jelly protein 1 (MRJP1)* de *Apis mellifera* con 69.21% y por último la *Bee-milk protein (MRJP3)* de *Apis mellifera carnica* con un 57.68% de cobertura.

Cabe mencionar que en cada uno de estos hits existe una cantidad significativa de péptidos derivados de varias proteínas debido a la presencia de proteínas homólogas, isoformas o entradas redundantes en la base de datos, por ello se solicitó la lista completa de proteínas para determinar exactamente cuantas y cuales están presentes en la jalea real. Cuadro 4.

Entrada	Nombre
MRJP1_APIME	Major royal jelly protein 1 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP1 PE 1 SV 1
Q8MMJ1_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP1 PE 2 SV 2
Q5VLE2_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 PE 2 SV 1
A0A1Q1N6G0_APICA	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera carnica</i> OX 88217 GN MRJP2 PE 3 SV 1
Q3L632_APICA	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera carnica</i> OX 88217 GN mrjp3 PE 3 SV 1
A0A7M7MQ90_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406091 PE 3 SV 1
Q5I224_APICE	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP1 PE 3 SV 1
MRJP2_APIME	Major royal jelly protein 2 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP2 PE 1 SV 1
Q6IMJ9_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP7 PE 2 SV 1
D3Y5T0_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1
MRJP3_APIME	Major royal jelly protein 3 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP3 PE 1 SV 1
A0A2A3EFY1_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 09306 PE 3 SV 1
MRJP5_APIME	Major royal jelly protein 5 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP5 PE 2 SV 1
D3JZ08_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1
A0A2A3EH93_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 06210 PE 3 SV 1
A0A7M7MQN8_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406116 PE 3 SV 1
V9IC18_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00543 2 PE 2 SV 1
Q5VK56_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 PE 2 SV 1
V9IA93_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00543 1 PE 2 SV 1
Q6QNI5_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP5 PE 2 SV 1
V9I6G8_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 9 PE 2 SV 1
V9I6T6_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 3 PE 2 SV 1
V9I763_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 6 PE 2 SV 1
Q3L631_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN mrjp3 PE 3 SV 1
D3GEU0_APIDO	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN mrjp1 PE 3 SV 1
D3JXA7_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1
Q3L630_APIFL	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp3 PE 3 SV 1
Q5I223_APICE	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP7 PE 3 SV 1
Q5I222_APICE	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP5 PE 3 SV 1
Q6W3E3_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN Mrjp6 PE 2 SV 1
MRJP4_APIME	Major royal jelly protein 4 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP4 PE 1 SV 1
D3GEU4_APIFL	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp5 PE 3 SV 1
V9I606_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 10 PE 2 SV 1
A0A2A3EH10_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 10183 PE 3 SV 1
A0A1Q1N6E9_APIDO	Bee milk protein OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN MRJP10 PE 3 SV 1
A0A7M7SQQ4_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406133 PE 3 SV 1
A0A2A3EHH1_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 06208 PE 3 SV 1
A0A2A3EG05_APICC	Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 09307 PE 3 SV 1
D3GEU5_APIFL	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp6 PE 3 SV 1
Q86M24_APIDO	Bee milk protein Fragment OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN mrjp3 PE 3 SV 2
Q9U8X6_APIME	Glucose oxidase OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406081 PE 2 SV 1
A0A2R4SV22_APICE	Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP4 PE 2 SV 1
A0A7M7MM52_APIME	uncharacterized protein LOC413627 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN LOC413627 PE 3 SV 1
B3GM12_APIME	Major royal jelly protein 1 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP1 PE 1 SV 1
MRJP1_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP9 PE 2 SV 1
Q4ZJX1_APIME	Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP9 PE 2 SV 1

Cuadro 4. Listado completo de las proteínas presentes en la jalea real.

Se detectaron un total de 45 proteínas correspondientes al género *Apis* en la jalea real de *Apis mellifera*, todas las proteínas fueron detectadas gracias a la base de datos obtenida a través de la página web Uniprot.org.

6.4 Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con las respectivas secuencias de las subunidades β de FSH de diferentes mamíferos

Cada una de las secuencias de las proteínas detectadas se compararon con la secuencia de subunidad β de FSH de borrega (junto con su sitio activo), de la vaca y la rata, además se comparó con la secuencia de la eCG. Cuadro 5.

Nombre	Entrada	%FSHB OVEJA	% Sitio activo FSHB Oveja	%FSHB BOVINO	%FSHB RATA	% eCGB CABALLO
Major royal jelly protein 1 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP1 PE 1 SV 1	MRJP1_APIME	24.79%	25.42%	24.79%	24.79%	20.99%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP1 PE 2 SV 2	Q8MMJ1_APICE	23.42%	23.73%	19.83%	20.17%	22.93%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 PE 2 SV 1	Q5VLE2_APICC	23.42%	23.73%	19.83%	21.01%	23,57%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera carnica</i> OX 88217 GN MRJP2 PE 3 SV 1	A0A1Q1N6G0_APICA	23,21%	30,51%	24,11%	16,39%	20,65%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera carnica</i> OX 88217 GN mrjp3 PE 3 SV 1	Q3L632_APICA	16,67%	25,42%	22,05%	18,85%	21,88%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406091 PE 3 SV 1	A0A7M7MQ90_APIME	23.21%	30.51%	24.11%	16.39%	20.65%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP1 PE 3 SV 1	Q5I224_APICE	25,49%	27,08%	20,56%	22,89%	23,84%
Major royal jelly protein 2 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP2 PE 1 SV 1	MRJP2_APIME	23,21%	32,20%	24,11%	16,39%	21,25%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP7 PE 2 SV 1	Q6IMJ9_APIME	15,52%	30,51%	15,52%	20,54%	22,22%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1	D3Y5T0_APIME	16,67%	25,42%	22,05%	18,03%	21,88%

Nombre	Entrada	%FSHB OVEJA	% Sitio activo FSHB Oveja	%FSHB BOVINO	%FSHB RATA	% eCGB CABALLO
Major royal jelly protein 3 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP3 PE 1 SV 1	MRJP3_APIME	15,83%	25,42%	15,83%	18,03%	20,62%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 09306 PE 3 SV 1	A0A2A3EFY1_APICC	11,76%	13,56%	11,76%	13,68%	17,11%
Major royal jelly protein 5 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP5 PE 2 SV 1	MRJP5_APIME	14,75%	18,64%	14,75%	18,03%	19,38%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1	D3JZ08_APIME	16,95%	18,64%	14,75%	18,85%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 06210 PE 3 SV 1s	A0A2A3EH93_APICC	16,95%	18,64%	14,75%	18,85%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406116 PE 3 SV 1	A0A7M7MQN8_APIME	16,95%	23,73%	15,57%	18,85%	22,08%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00543 2 PE 2 SV 1	V9IC18_APICE	19,66%	18,64%	15,20%	20,66%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 PE 2 SV 1	Q5VK56_APICC	19,66%	18,64%	15,20%	20,66%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00543 1 PE 2 SV 1	V9IA93_APICE	19,66%	18,64%	15,20%	20,66%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP5 PE 2 SV 1	Q6QNI5_APICE	19,66%	20,34%	15,20%	20,66%	21,43%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 9 PE 2 SV 1	V9I6G8_APICE	15,00%	23,73%	22,83%	18,85%	19,02%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 3 PE 2 SV 1	V9I6T6_APICE	15,00%	25,42%	22,05%	18,85%	21,25%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 6 PE 2 SV 1	V9I763_APICE	15,00%	25,42%	22,05%	18,85%	21,25%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN mrjp3 PE 3 SV 1	Q3L631_APICE	15,00%	25,42%	22,05%	18,85%	21,25%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN mrjp1 PE 3 SV 1	D3GEU0_APIDO	18,27%	22,00%	15,89%	23,38%	21,48%

Nombre	Entrada	%FSHB OVEJA	% Sitio activo FSHB Oveja	%FSHB BOVINO	%FSHB RATA	% eCGB CABALLO
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 PE 2 SV 1	D3JXA7_APIIME	14,88%	18,64%	17,50%	17,36%	23,33%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp3 PE 3 SV 1	Q3L630_APIFL	17,89%	25,42%	16,28%	21,54%	19,28%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP7 PE 3 SV 1	Q5I223_APICE	22,22%	25,00%	21,30%	21,43%	24,75%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP5 PE 3 SV 1	Q5I222_APICE	19,44%	18,64%	20,00%	20,18%	20,30%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN Mrjp6 PE 2 SV 1	Q6W3E3_APIIME	16,53%	22,03%	14,63%	19,67%	20,78%
Major royal jelly protein 4 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP4 PE 1 SV 1	MRJP4_APIIME	17,46%	18,64%	17,50%	17,36%	22,60%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp5 PE 3 SV 1	D3GEU4_APIFL	16,98%	23,73%	16,67%	20,00%	18,37%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN ACCB00004 10 PE 2 SV 1	V9I606_APICE	19,00%	13,79%	18,52%	15,00%	19,83%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 10183 PE 3 SV 1	A0A2A3EH10_APICC	15,00%	16,95%	15,83%	19,67%	22,22%
Bee milk protein OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN MRJP10 PE 3 SV 1	A0A1Q1N6E9_APIDO	20,18%	16,95%	19,30%	19,30%	24,68%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406133 PE 3 SV 1	A0A7M7SQQ4_APIIME	18,25%	22,03%	19,84%	19,83%	24,44%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 06208 PE 3 SV 1	A0A2A3EHH1_APICC	19,83%	20,34%	19,83%	20,18%	22,61%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana cerana</i> OX 94128 GN APICC 09307 PE 3 SV 1	A0A2A3EG05_APICC	21,21%	16,95%	21,78%	20,20%	19,70%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis florea</i> OX 7463 GN mrjp6 PE 3 SV 1	D3GEU5_APIFL	21,59%	24,49%	21,88%	18,29%	21,70%
Bee milk protein Fragment OS <i>Apis dorsata</i> OX 7462 GN mrjp3 PE 3 SV 2	Q86M24_APIDO	23,08%	23,73%	20,16%	22,31%	19,53%

Nombre	Entrada	%FSHB OVEJA	% Sitio activo FSHB Oveja	%FSHB BOVINO	%FSHB RATA	% eCGB CABALLO
Glucose oxidase OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN 406081 PE 2 SV 1	Q9U8X6_APIME	16.39%	20.93%	11.02%	13.60%	19.44%
Bee milk protein OS <i>Apis cerana</i> OX 7461 GN MRJP4 PE 2 SV 1	A0A2R4SV22_APICE	20,63%	23,73%	20,63%	19,01%	23,18%
uncharacterized protein LOC413627 OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN LOC413627 PE 3 SV 1	A0A7M7MM52_APIME	21.85%	22.03%	19.83%	23.20%	22.58%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP9 PE 2 SV 1	B3GM12_APIME	22,31%	22,03%	21,62%	24,39%	17,82%
Bee milk protein OS <i>Apis mellifera</i> OX 7460 GN MRJP9 PE 2 SV 1	Q4ZJX1_APIME	20,66%	22,03%	23,42%	24,39%	17,82%

En cada una de las proteínas obtenidas se registraron los porcentajes de similitud obtenidos con la función "Align" del sitio web Uniprot.org y se marcaron en verde los porcentajes más altos para cada una de las proteínas. De manera general, los porcentajes de similitud de todas las proteínas rondan entre el 20 y 30% aproximadamente.

Las comparaciones muestran que 25 de las 45 proteínas presentan el porcentaje de similitud más alto con la secuencia del sitio activo de la subunidad β de la FSH de ovino, mientras que 16 de ellas presentan su porcentaje más alto con la secuencia de eCG, 3 de ellas tienen su porcentaje más alto con la subunidad de β de FSH de rata y solo una de ellas presenta su porcentaje más alto con la subunidad de β de FSH de bovino.

7. Discusión

El presente trabajo se diseñó con el fin de conocer si existe una isoforma proteica de la hormona folículo estimulante (FSH). De acuerdo con nuestro conocimiento esta es la primera vez que se intenta buscar dicha hormona en la jalea real por medio de extracción y purificación de proteínas, espectrometría de masas y comparación de sus secuencias de aminoácidos para determinar sus porcentajes de similitud.

Aunque existen estudios que realizan un análisis exhaustivo de las proteínas de la jalea real, la mayoría se ven obstaculizados por la enorme abundancia de algunas proteínas de la familia *Major Royal Jelly Proteins (MRJP)* que constituye el 80-90% del proteoma de la jalea real (Schönleben et al., 2007). La alta heterogeneidad de estas proteínas es un desafío adicional para el análisis proteómico, ya que requiere el uso de técnicas analíticas que proporcionen una alta resolución y un amplio rango dinámico (Schönleben et al., 2007).

Pero es bien sabido que la técnica de electroforesis en gel 2D tiene la ventaja de visualizar las proteínas modificadas como puntos múltiples, mientras que excluye algunas de las proteínas con baja abundancia con un punto isoelectrico (pI) de (<3, >10) y un peso molecular (mr) de (<15 o >250 kDa), por el contrario, la estrategia para el espectrómetro de masas de *shotgun* es en gran medida imparcial, lo que permite identificar proteínas de abundancia alta y baja para proteínas con extremos en pI y mr con sensibilidades iguales (Thingholm et al., 2009), es por esto que decidimos utilizar estas técnicas para la determinación del proteoma de la jalea real.

Basándonos en los antecedentes sobre la cantidad de proteínas presentes en la jalea real, Li y colaboradores en 2007, compararon el complemento proteico de la jalea real de abejas *Apis mellifera*, de una estirpe de *Apis mellifera* seleccionada artificialmente para aumentar la producción de jalea real y de abejas melíferas *Apis mellifera carnica*; las proteínas se identificaron mediante el uso de una combinación de electroforesis en gel de 2D y espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS), sus resultados mostraron la identificación de 152, 157 y 137 proteínas en las tres jaleas reales, respectivamente.

Por su parte, Thingholm y colaboradores en 2009, realizaron el análisis proteómico de la jalea real de *Apis mellifera* por medio de las técnicas de electroforesis en gel 2D, cromatografía líquida multidimensional (MDLC) e identificación por LC-MS/MS, de esta manera, identificaron 20 proteínas diferentes en total.

Yu y colaboradores en 2010, compararon la jalea real producida por *Apis mellifera* y *Apis cerana* mediante electroforesis en gel 2D, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS) y espectrometría de masas en tándem de tiempo de vuelo cuádruple de chip (LC-Chip/ESI-QTOF MS), identificando 52 y 60 proteínas en la jalea real de *Apis mellifera* y *Apis cerana* respectivamente.

Todos estos antecedentes difieren del resultado de la cantidad total de proteínas obtenidas en este trabajo, esto se puede deber a que cada uno de estos métodos solo generan ciertas subpoblaciones de un proteoma debido al sesgo específico de cada método, por lo que es necesaria la aplicación de varias técnicas electroforéticas y cromatográficas para facilitar una descripción general completa del patrón de proteínas de la jalea real (Schönleben et al., 2007). En lo que respecta a los porcentajes de similitud de las proteínas, para el caso de secuencias de aminoácidos, se considera que dos proteínas son homólogas si tienen un 25% o más de similitud, lo cual puede considerarse una evidencia de que esas secuencias tienen un ancestro común (Brown, 2000).

En este trabajo de observo que todas las proteínas que se identificaron en la jalea real presentan entre un 20-30% de similitud aproximadamente, con la secuencias de la subunidades β de FSH borrega (junto con su sitio activo), de la vaca, la rata y la gonadotropina coriónica equina (eCG), siendo la secuencia del sitio activo de la subunidad β de FSH de borrega la que presenta los mayores porcentajes de similitud, alcanzando hasta 32.20% de similitud con la *Major royal jelly protein 2 (MRJP2)* de *Apis mellifera*, proteína que se sabe que puede actuar de manera *in vitro e in vivo* como agente antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, factor cicatrizante y antiinflamatorio, pero hasta donde sabemos, esta proteína no tiene ningún efecto sobre la reproducción y la fertilidad de las abejas melíferas (Mureşan et al., 2022).

Ya que ninguna de las proteínas identificadas presenta un porcentaje de similitud alto con las subunidades β de FSH de las distintas especies, no es posible discernir si alguna de ellas es significativamente similar estructuralmente a la hormona FSH de un mamífero, pero recordemos que existe el antecedente de proteínas con un bajo porcentaje de similitud que pueden tener el mismo efecto en un organismo, como es el caso de la FSH con la eCG que presentan entre un 18-45% de similitud entre ellas y actúan de la misma manera (Combarnous, 1988). Ya que la eCG tiene la particularidad de provocar un efecto similar tanto al de FSH como al de LH en especies diferentes a los equinos; las bases biológicas para esta doble actividad están dadas por la particularidad de los receptores de FSH en mamíferos que permiten la unión con la eCG (Moore y Ward, 1980).

8. Conclusión

Con base en las comparaciones de las proteínas obtenidas en la espectrometría de masas con la secuencia de la subunidad β de FSH de distintas especies, podemos decir que ninguna de ellas es significativamente similar estructuralmente a la hormona FSH de mamífero, pero no se descarta que alguna(s) de estas proteínas tengan el mismo efecto que esta hormona ya que en la naturaleza existen casos de proteínas completamente distintas que pueden presentar la misma actividad biológica en un organismo.

9. Bibliografía

1. Andreone L. Nuevos aspectos de la regulación endocrina y paracrina de la producción gonadal de inhibinas y activina A. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2014.
2. Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V, Robertson WR. Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1998;4(7):631–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/4.7.631>
3. Assidi M, Richard FJ, Sirard M-A. FSH in vitro versus LH in vivo: similar genomic effects on the cumulus. *J Ovarian Res* [Internet]. 2013;6(1):68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1757-2215-6-68>
4. Barrios-de-Tomasi J, Nayudu PL, Brehm R, Heistermann M, Zariñán T, Ulloa-Aguirre A. Effects of human pituitary FSH isoforms on mouse follicles in vitro. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2006;12(4):428–41. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310619955>
5. Berger P, Laphorn AJ. The molecular relationship between antigenic domains and epitopes on hCG. *Mol Immunol* [Internet]. 2016;76:134–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589016301171>
6. Bhartiya D, Patel H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. *J Ovarian Res* [Internet]. 2021;14(1):144. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13048-021-00880-3>
7. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M-A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine Oocytes1. *Biol Reprod* [Internet]. 2002 [citado el 29 de diciembre de 2022];66(1):38–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11751261/>
8. Brown SM. Bioinformatics. A biologist's guide to biocomputing and the internet. New York: Eaton Publishing; 2000.
9. Butler ST, Pelton SH, Knight PG, Butler WR. Follicle-stimulating hormone isoforms and plasma concentrations of estradiol and inhibin A in dairy cows with ovulatory and non-ovulatory follicles during the first postpartum follicle wave. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2008;35(1):112–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724008000283>
10. Caixeta ES, Machado MF, Ripamonte P, Price C, Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2013 [citado el 29 de diciembre de 2022];25(6):890–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23021259/>
11. Castro Chávez N. Evaluación de la eficiencia reproductiva de cabras (*Capra hircus*) tratadas con esponjas intravaginales impregnadas con jalea real de abejas (*Apis mellifera*) vs cabras tratadas con controlled internal drug release CIDR. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.

12. Chuan Ma, Beibei Ma, Jianke Li, Yu Fang. Changes in chemical composition and antioxidant activity of royal jelly produced at different floral periods during migratory beekeeping, Food Research International [Internet]. 2022 [citado 2022];155(2022). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399692200148X>
13. Combarnous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. Reprod Nutr Dev [Internet]. 1988 [citado el 21 de diciembre de 2022];28(2A):211–28. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00898783>
14. Crane E. Apis Species. En: Resh VH, Cardé RT, editores. Encyclopedia of Insects. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier; 2009. p. 31–2.
15. De Rensis F, López-Gatius F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. Reprod Domest Anim [Internet]. 2014;49(2):177–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12268>
16. Dias JA, Mahale SD, Nechamen CA, Davydenko O, Thomas RM, Ulloa-Aguirre A. Emerging roles for the FSH receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 τ interaction domain with a canonical G-protein interaction site. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2010;329(1–2):17–25. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720710002807>
17. Elnagar SA. Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility". Anim Reprod Sci [Internet]. 2010;121(1–2):174–80. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010003076>
18. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. Nature [Internet]. 2005 [citado el 29 de octubre de 2022];433(7023):269–77. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature03206>
19. Gimenez-Diaz C, Emsen B, Emsen E, Kutluca M, Koycegiz F. Improved reproductive response of sheep in intrauterine insemination program with the use of royal jelly. Afr J Biotechnol [Internet]. 2012 [citado el 1 de mayo de 2022];11(61):12518–21. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129045>
20. Hansson VV, Skalhegg BS, Tasken K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. J Steroid Biochem Mol Biol [Internet]. 2000;73(1–2):81–92. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076000000571>
21. Hoppen HO. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin—an overview. Exp Clin Endocrinol [Internet]. 1994 [citado el 21 de noviembre de 2022];102(3):235–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7995345/>
22. Huo X, Wu B, Feng M, Han B, Fang Y, Hao Y, et al. Proteomic analysis reveals the molecular underpinnings of mandibular gland development and lipid metabolism in two lines of honeybees (*Apis mellifera ligustica*). J Proteome Res [Internet]. 2016;15(9):3342–57. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00526>
23. Husein MQ, Haddad SG. A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. Anim Reprod Sci [Internet]. 2006;93(1–2):24–33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200500182X>

24. Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* [Internet]. 2011 [citado el 2 de noviembre de 2022];473(7348):478–83. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature10093?message-global=remove&lang=en>
25. Kimura M, Kimura Y, Tsumura K, Okihara K, Sugimoto H, Yamada H, et al. 350-kDa royal jelly glycoprotein (apisin), which stimulates proliferation of human monocytes, bears the beta1-3galactosylated N-glycan: analysis of the N-glycosylation site. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2003;67(9):2055–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.67.2055>
26. Knecht D, Kaatz HH. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 1990 [citado el 2 de noviembre de 2022];21(5):457–68. Disponible en: https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1990/05/Apidologie_0044-8435_1990_21_5_ART0007/Apidologie_0044-8435_1990_21_5_ART0007.html
27. Li J, Wang T, Zhang Z, Pan Y. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007;55(21):8411–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0717440>
28. Liu X, Jiang C, Chen Y, Shi F, Lai C, Shen L. Major royal jelly proteins accelerate onset of puberty and promote ovarian follicular development in immature female mice. *Food Sci Hum Wellness* [Internet]. 2020;9(4):338–45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453020301518>
29. López J, Salinas D, Baracaldo-Martínez A, Gómez C, Herrera Ibatá D, Atuesta-Bustos JE. Efecto de la dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) asociada a protocolos cortos de sincronización de celo sobre el desempeño reproductivo de ovejas de pelo. *Rev Investig Vet Peru* [Internet]. 2021 [citado el 29 de diciembre de 2022];32(1):e17775. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172021000100013
30. Manteca Vilanova X, De Briyne N, Beaver B, Turner PV. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals (Basel)* [Internet]. 2019 [citado el 21 de noviembre de 2022];9(12):1053. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ani9121053>
31. Marshall GR. FSH (Follicle-Stimulating Hormone). En: Martini L, editor. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier; 2004. p. 75–80.
32. Melliou Eleni IC. Chapter 8 - Chemistry and Bioactivities of Royal Jelly. En: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 2022]. p. 261–90. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444634306000084?via%3Dihub>
33. Mishima S, Suzuki K-M, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, et al. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2005;101(1–3):215–20. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105002916>
34. Moore WT Jr, Ward DN. Pregnant mare serum gonadotropin. An in vitro biological characterization of the lutropin-follitropin dual activity. *J Biol Chem* [Internet]. 1980 [citado el 21 de diciembre de 2022];255(14):6930–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6248538/>

35. Motta Delgado, P. A., Ramos Cuéllar, N., González Sánchez, C. M., y Castro Rojas, E. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Veterinaria Y Zootecnia*, 5(2), 88-99.
36. Mureşan CI, Dezmirean DS, Marc BD, Suharoschi R, Pop OL, Buttstedt A. Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. *J Funct Foods* [Internet]. 2022;98(105286):105286. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464622003565>
37. Nijhout HF, Wheeler DE. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Q Rev Biol* [Internet]. 1982;57(2):109–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1086/412671>
38. Pavel CI, Mărghitaş LA, Bobiş O, Dezmirean DS, Şapcaliu A, Radoi I, et al. Biological activities of royal jelly - review. *Lucr ştiinţ* [Internet]. 2011 [citado el 1 de mayo de 2022];44(2):108–18. Disponible en: <https://doaj.org/article/0b5a5ae04f934fcc33a911979d4b10d>
39. Pérez Herrera HM. Efectos de la jalea real en la vía dependiente de FSH durante la expansión del complejo cumulus- ovocito de bovino. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2021.
40. Ramanathan ANKG, Nair AJ, Sugunan VS. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *J Funct Foods* [Internet]. 2018;44:255–64. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464618300884>
41. Rangel Porta LE. Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos. DR© 2018, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México: UNAM; 2018.
42. Recchia K, Jorge AS, Pessôa LV de F, Botigelli RC, Zugaib VC, de Souza AF, et al. Actions and roles of FSH in germinative cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado el 1 de mayo de 2022];22(18):10110. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/10110>
43. Rippe CA. EL CICLO ESTRAL. Dairy Cattle Reproduction Conference [Internet]. 2009 [citado el 29 de octubre de 2022]; Disponible en: https://www.academia.edu/32410936/EL_CICLO ESTRAL?from=cover_page
44. Ruiz-Gálvez KV. Comparación del uso de jalea real de *Apis mellifera* como reemplazo del suero fetal bovino durante la maduración in vitro de ovocitos de ovino colectados durante época reproductiva y anestro estacional. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2021.
45. Salgado-Albarrán M, Herrera-Díaz J, Dinkova TD. Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *SUGERENCIA* [Internet]. 2015;18(1):43–51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X15000054>
46. Salhab M, Dhorne-Pollet S, Auclair S, Guyader-Joly C, Brisard D, Dalbies-Tran R, et al. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells: IVM AFFECTS CUMULUS CELLS SIGNALING. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2013;80(2):166–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22148>
47. Santi D, Casarini L, Marshall GR, Simoni M. Follicle-Stimulating Hormone (FSH). En: Huhtaniemi I, Martini L, editores. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier; 2018. p. 149–56.

48. Scarselli R, Donadio E, Giuffrida MG, Fortunato D, Conti A, Balestreri E, et al. Towards royal jelly proteome. *Proteomics* [Internet]. 2005;5(3):769–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401149>
49. Schmitzová J, Klaudiny J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1998;54(9):1020–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050229>
50. Schönleben S, Sickmann A, Mueller MJ, Reinders J. Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2007;389(4):1087–93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1498-2>
51. Shahzad Q, Mehmood MU, Khan H, ul Husna A, Qadeer S, Azam A, et al. Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2016;167:83–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432016300501>
52. Simonetti I, Irouleguy J, Cabodevila J, Callejas S. Efecto de la incorporación de eCG al tratamiento superovulatorio convencional en bovinos [Internet]. [Buenos Aires]: Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA; 2019 [citado el 29 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://ridaa.unicen.edu.ar:8443/server/api/core/bitstreams/585df08a-8df4-46c6-ab19-548f2fd2eca6/content>
53. Simoni M, Casarini L. Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2014 [citado el 29 de octubre de 2022];170(3):R91-107. Disponible en: <https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/170/3/R91.xml>
54. Smith JT. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2012;43(2):75–84. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724011001536>
55. Suwannapong G, Chaiwongwattanakul S, Benbow ME. Histochemical Comparison of the Hypopharyngeal Gland in *Apis cerana* Fabricius, 1793 Workers and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 Workers. *Psyche (Camb Mass)* [Internet]. 2010 [citado el 2 de noviembre de 2022];2010:1–7. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/psyche/2010/181025/>
56. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* [Internet]. 2009;9(6):1451–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800454>
57. Veshkini A, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Ghanem N, Abazari-Kia AH, Mottaghi E, Kamaledini R, et al. Oocyte maturation with royal jelly increases embryo development and reduces apoptosis in goats. *Anim Reprod* [Internet]. 2018 [citado el 1 de mayo de 2022];15(2):124–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR986>
58. Villalobos-M A, Agudelo M JC, Arrieta P DM. HISTOLOGÍA DE APIS MELLIFERA LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA) COMO APORTE ENTOMOLÓGICO: PARTE I: REGIONES CORPORALES, ORGANIZACIÓN ANATÓMICA E INTEGUMENTO. *Bol Cient Mus Hist Nat Univ Caldas* [Internet]. 2010 [citado el 30 de diciembre de 2022];14(2):201–14. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30682010000200014&lng=e&nrm=iso&tlng=es

59. West CR, Carlson NE, Lee JS, McNeilly AS, Sharma TP, Ye W, et al. Acidic mix of FSH isoforms are better facilitators of ovarian follicular maturation and E2 production than the less acidic. *Endocrinology* [Internet]. 2002;143(1):107–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.143.1.8601>
60. Yu F, Mao F, Jianke L. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *J Proteome Res* [Internet]. 2010 [citado el 21 de diciembre de 2022];9(5):2207–15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20307072/>

