



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**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**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

KARLA VANESSA RUIZ GÁLVEZ

Asesores:

Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro

MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021.





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.

"Cuanto mayor es la duda, más grande es el despertar:  
cuanto menor es la duda, más pequeño es el despertar.  
Cuando no hay duda, no hay despertar"

-C. C. Chang, La práctica del Zen.

## **DEDICATORIA**

Con todo mi corazón para mi madre, sin tu amor no podría lograrlo.  
Y en memoria de mi padre, mi amigo... todos los días te extraño.

“Nada en la vida debe ser temido, solamente  
comprendido. Ahora es el momento de  
comprender más para temer menos.”

-Marie Curie

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, la Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro por darme la oportunidad de elaborar este proyecto, por el apoyo y paciencia durante el proceso, por compartirme su conocimiento y experiencia, fortalecer mi interés en la ciencia y por confiar en mí. Al MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez por sus ideas y su disposición incondicional en la realización de este trabajo de tesis.

A la Clínica de Reproducción Equina del CEIEPAA de la FMVZ, junto con su responsable la MVZ Maricruz Díaz Durán y a la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAZ, por permitirme utilizar sus instalaciones durante la maduración *in vitro* de ovocitos.

A mis compañeros durante este proceso, M en MVZ Angélica Daniela Reyes Perea por su orientación para llevar a cabo los experimentos durante la elaboración de esta tesis y por sus consejos para esta y futuras investigaciones. A Héctor Manuel Pérez Herrera, Ricardo Yavé Escamilla Casillas, Santos Iván Pérez Muñiz y Europa Meza Serrano, por apoyarme en el trabajo de laboratorio con la mejor disposición y aconsejarme con su experiencia.

A mis amigas: Cess, por creer en mi e impulsarme todos los días a ser mejor, por apoyarme incondicionalmente académica y personalmente. A Luz, Fernanda, Alejandra, Bety y Gloria, por los consejos y la compañía durante este proceso.

Al jurado por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y por sus valiosas observaciones.

Al rastro TIF 412 ubicado en Querétaro y al rastro municipal TIF 462 ubicado en Zacatecas que me permitieron obtener el material biológico necesario para este proyecto.

Al proyecto PAPIIT IA205220 por los recursos económicos para la elaboración de esta investigación.

## **CONTENIDO**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA OVEJA .....	4
OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS .....	9
ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA .....	14
CICLO ESTRAL .....	16
ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN LA OVEJA .....	19
REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN OVINOS.....	22
SUERO FETAL BOVINO (FBS) .....	24
JALEA REAL.....	26
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
FASES DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	32
OBTENCIÓN Y MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS.....	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
TASA DE OBTENCIÓN DE OVOCITOS.....	41
TASA DE MADURACIÓN DURANTE EL PROCESO DE INCUBACIÓN.....	41
TASA DE MADURACIÓN DE OVOCITOS CON JR.....	45
TASA DE MADURACIÓN DE OVOCITOS CON FBS.....	46

TASA DE MADURACIÓN DE OVOCITOS EN ANESTRO ESTACIONAL.....	47
TASA DE MADURACIÓN DE OVOCITOS EN ÉPOCA REPRODUCTIVA .....	48
TASAS DE MADURACIÓN DURANTE LA TRANSICIÓN EN EL PROCESO DE INCUBACIÓN .....	49
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>
LISTA DE FIGURAS.....	61
LISTA DE CUADROS.....	62
ABREVIATURAS .....	62
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>

## RESUMEN

RUIZ GÁLVEZ KARLA VANESA. Comparación del uso de jalea real de *Apis mellifera* como reemplazo del suero fetal bovino durante la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos colectados en época reproductiva y anestro estacional (bajo la dirección de MVZ PhD Hilda Morayma Guerrero Netro, MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez y M en MVZ Angélica Daniela Reyes Perea).

La maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos es el primer paso para la producción de embriones *in vitro* (IVEP) en cualquier especie. Sin embargo, en pequeños rumiantes estos procesos continúan siendo ineficientes, por lo que es importante actualizar los protocolos existentes de IVM de acuerdo con las necesidades productivas y reproductivas de esta especie, tomando en cuenta las posibles variables fisiológicas, siendo una de las más importantes la estacionalidad y su efecto sobre la calidad folicular y por ende de los ovocitos, la cual disminuye durante el anestro debido al decremento en la producción de gonadotropinas. En los protocolos de IVM, es común suplementar al medio con suero fetal bovino (FBS); sin embargo, su uso representa desventajas desde el punto de vista biológico-celular, como es que no todas las sustancias presentes en el FBS se han identificado y de las que sí han sido identificadas, la función en las células cultivadas no está clara por lo que es preciso desarrollar estrategias para reducir o reemplazar su uso. La jalea real (JR) es un producto de la secreción de las glándulas hipo-faríngeas y mandibulares de las abejas (*Apis mellifera*), se ha reportado que *in vitro*, posee actividad estrogénica similares a los producidos por 17 $\beta$ -estradiol (E2), lo cual se ha comprobado mejora la maduración citoplasmática que es necesaria para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, adicionalmente la JR posee gonadotropinas y aminoácidos que promueven la actividad enzimática para la expansión de las células del cumulus, proceso necesario para la maduración ovocitaria, lo anterior ha demostrado aumentar la tasa de maduración de ovocitos al incorporarla en medios de maduración convencionales. El objetivo general del presente trabajo fue comparar la tasa de maduración de ovocitos de ovinos utilizando un medio de maduración convencional adicionado con FBS o adicionado con JR, en ovocitos recolectados en anestro estacional y época reproductiva. Se obtuvieron ovarios del rastro TIF 412 de Querétaro durante la época de anestro y del rastro TIF 462 de Zacatecas durante la época reproductiva. Se realizó la IVM con ambos tratamientos y se evaluó el grado de maduración alcanzado a las 2, 6, 12 y 27 horas. La tasa de maduración de ovocitos en la época de anestro reproductivo obtenida fue del 66% en el grupo adicionado con JR y del 28.3% utilizando FBS, mientras que en época reproductiva se obtuvo un 80% y 60% respectivamente. Los resultados anteriores mostraron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas épocas utilizando FBS, mientras que la comparación entre los resultados obtenidos con JR no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), demostrando que la JR funciona como reemplazo para el FBS independientemente de la época en la que se colecten los ovocitos. Estos hallazgos resaltan la importancia de continuar estudiando los efectos moleculares de ambos tratamientos en el futuro.

## INTRODUCCIÓN

La maduración de ovocitos se refiere al proceso en el que la célula germinal completa la primera división meiótica con la formación del primer cuerpo polar y la generación de ovocitos en metafase II (1). *In vitro*, este proceso se realiza con ovocitos recuperados de folículos preantrales antes de alcanzar las etapas de selección y dominancia (2). La maduración *in vitro* IVM es una técnica bien establecida y ampliamente aplicada para la producción de embriones *in vitro* de animales de producción (3). *In vivo*, los ovocitos son rodeados por células del cumulus (CC), las cuales canalizan metabolitos y nutrientes al ovocito, estimulan la ruptura de la vesícula germinal y el inicio de la metafase II. Estos procesos son necesarios para el ovocito durante el proceso de maduración (4,5), por lo que, uno de los principales indicadores de maduración es la expansión de las CC que rodean al ovocito (1).

La estacionalidad de la reproducción en algunas especies, es un mecanismo de adaptación desarrollado como estrategia para minimizar el impacto negativo del ambiente en la supervivencia de las crías (6). En ovinos, los procesos reproductivos son dependientes de la estacionalidad, presentando una fase de anestro estacional durante los días largos, y una época reproductiva durante los días cortos (7–10). Estudios previos han demostrado que la estacionalidad está relacionada directamente con la calidad ovocitaria, lo cual tiene un impacto directo en la eficiencia de producción de embriones *in vitro* (11,12). Se ha reportado en ovocitos de ovinos madurados y fertilizados *in vitro* en ambas épocas del año (reproductiva y anestro), una tasa de desarrollo embrionario de 42% durante época reproductiva en comparación con 37% durante la época de anestro (12,13), lo cual indica que al realizar producción de embriones *in vitro* de ovocitos recuperados durante época de anestro es posible encontrar una reducción significativa en el número de blastocistos viables, independientemente de las condiciones del medio de maduración (12).

En la IVM es común suplementar los medios con suero fetal bovino (FBS) (14). EL FBS contiene hormonas, vitaminas, proteínas de transporte y factores de crecimiento, estos últimos tienen un papel importante en la regulación de la maduración de los ovocitos, particularmente a través de las CC (15). Sin embargo, el uso del FBS en los cultivos celulares



también tiene desventajas, ya que es una mezcla de componentes con variaciones cualitativas y cuantitativas, de acuerdo con la diversidad estacional y geográfica entre cada lote. Asimismo, desde aspectos de bioseguridad, el FBS puede contener factores adversos, como endotoxinas, contaminantes virales o proteínas priónicas (16,17).

La jalea real (JR) es producto de la secreción de las glándulas hipo-faríngeas y mandibulares de las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) (18). La composición general de la JR es 67% agua, 12.5% proteína cruda, 11% monosacáridos y 5% ácidos grasos (19). Se han documentado impactos positivos de su uso en productos médicos por su función antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria y como inmunomodulador, acciones que han beneficiado la salud humana y animal (20). Asimismo, se ha reportado que esta mezcla de nutrientes, contiene testosterona y actividad estrogénica con efectos *in vivo* e *in vitro* similares a los producidos por 17 beta-estradiol (E2) (21,22). Las propiedades de la JR en reproducción se han probado experimentalmente dando como resultado un incremento en la tasa de maduración de ovocitos en cabras (23), un aumento en la capacidad de congelación espermática en búfalos (24) y en la disminución de la infertilidad estacional en conejos (18,19). En este trabajo se evaluó la tasa de maduración de ovocitos de oveja utilizando la JR como sustituto del FBS en ovocitos colectados durante época reproductiva y de anestro.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

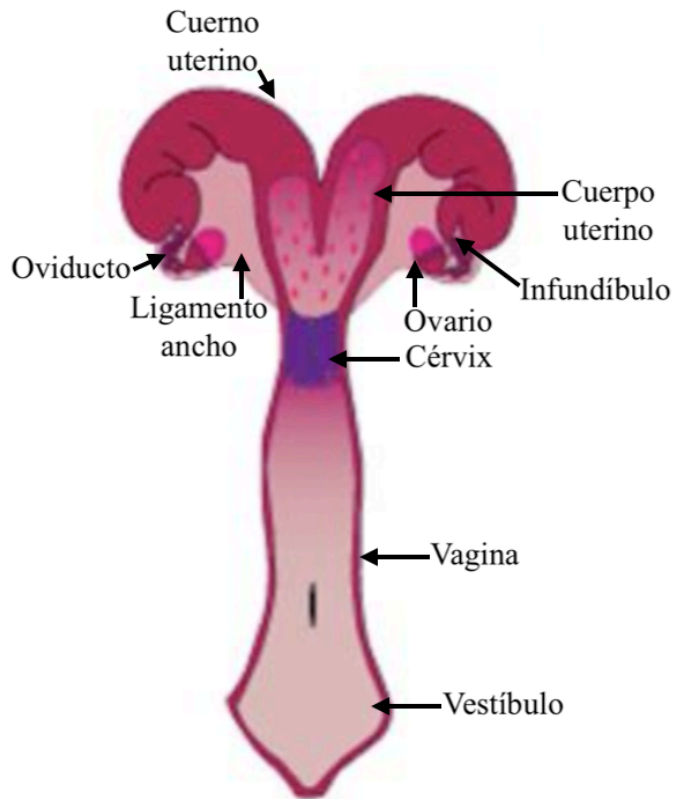
### **Anatomía del aparato reproductor de la oveja**

El aparato reproductor de la oveja posee genitales externos (labios vulvares, clítoris) e internos (vagina, cérvix, útero, oviductos y ovarios) (25). La vulva está formada por dos labios compuestos por tejido adiposo y porciones del músculo constrictor de la vulva cubierto de piel. Los labios están diferenciados por las comisuras ventral y dorsal. El clítoris es el órgano homólogo al pene y posee tejido eréctil. El vestíbulo vaginal se localiza craneal al clítoris, está cubierto por epitelio escamoso estratificado y abundantes glándulas mucosas localizadas a lo largo del orificio uretral (25).

La porción tubular del tracto reproductivo (vagina, cérvix, útero y oviducto), se compone por una capa externa serosa, dos capas de tejido muscular, una submucosa y una capa mucosa. La vagina se localiza craneal al vestíbulo y está revestida por epitelio escamoso estratificado (25,26).

El cérvix se inicia en una ligera depresión en la porción más craneal de la vagina. El cérvix es una estructura fibrosa tubular, compuesta principalmente por tejido conectivo con una capa serosa externa y un epitelio interno hacia el lumen. El lumen es tortuoso debido a la presencia de 4 a 7 pliegues transversales sinuosos que proveen una barrera física para contaminantes externos (27,28).

Cranealmente al cérvix se encuentra el cuerpo uterino. La oveja tiene un útero bicornual compuesto de un cuerpo uterino corto (1 a 2 cm de longitud) y dos cuernos con una longitud de 10-12 cm que en estado no grávido se encuentran ligeramente enrollados y caen sobre el canal pélvico. La capa serosa del útero es sostenida en la cavidad abdominal por el ligamento ancho, el cual es altamente vascular y se divide en mesovario, que sostiene al ovario; mesosalpinx, que soporta al oviducto y mesometrio, que sostiene al útero. Los oviductos se unen a los cuernos uterinos en la bursa ovárica que en ovejas es abierta y ancha (26) (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía reproductiva de la oveja.**  
Modificado de O'Neal, (2015).

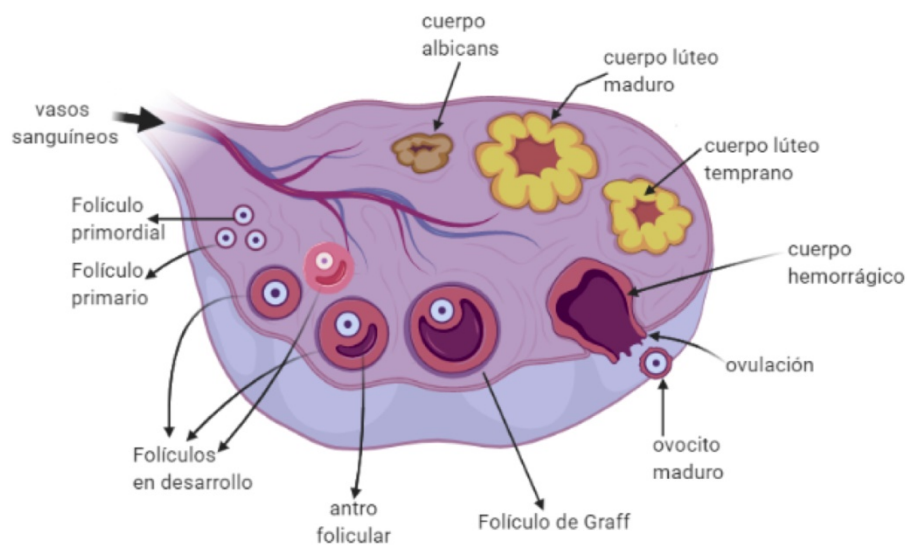
Los ovarios en la oveja son pequeños (1.5 a 2 cm) y ovals cubiertos parcialmente por la bursa ovárica.

### **El ovario**

Los ovarios de los pequeños rumiantes se describen como en forma de almendra, miden en promedio de 10-22 mm (29,30) y están sujetos al ligamento ancho por el mesovario. El ovario se divide en dos partes funcionales que son la corteza y la médula. El ovario presenta epitelio germinal en la superficie de la corteza ovárica que está cubierto con epitelio cúbico simple, además posee una cápsula con un revestimiento denso de tejido conectivo irregular llamado túnica albugínea (31).

En el estroma de la médula se organizan vasos sanguíneos y nervios que radian hacia la corteza. La corteza es una estructura dinámica con diversas estructuras, entre ellas se

encuentran folículos y cuerpos lúteos (CL). La mayoría de los folículos en el ovario no están en desarrollo y se les conoce como primordiales, una vez que un folículo primordial ha sido reclutado para desarrollarse, su tamaño, estructura y posición en la corteza comienzan a cambiar drásticamente, durante este proceso, el folículo pasa por tres etapas de desarrollo: folículo primario, secundario, terciario o de Graaf (Figura 2) (32). Durante la época reproductiva o la gestación de la oveja, los ovarios pueden presentar folículos en dichas etapas y uno o más cuerpos lúteos (CL) (25), mientras que durante la época de anestro, podemos observar sólo folículos pequeños y atrésicos (33).



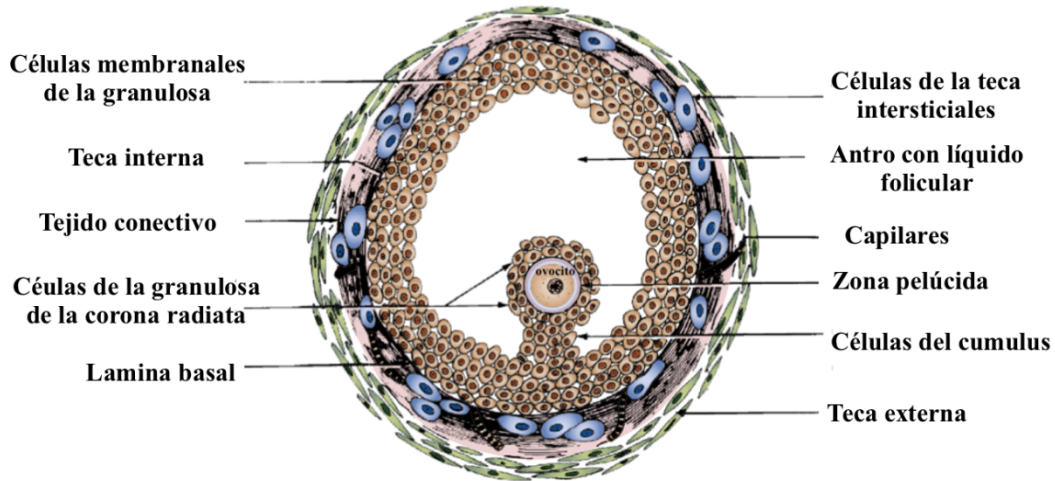
**Figura 2: Anatomía ovárica**

**Modelo de ovario mostrando el progreso de las etapas foliculares y desarrollo lúteo. Modificado de Netter, F. (1997)**

### **El folículo**

El folículo ovárico es la unidad fundamental de ovario, contiene al ovocito que eventualmente será ovulado, fertilizado y formará al embrión. Además, provee hormonas esteroideas y proteicas requeridas para el mantenimiento del ciclo estral, que inducen las características de receptividad sexual hacia el macho y la preparación del útero para la implantación del embrión (34).

Los folículos ováricos se constituyen por las células de la teca, granulosa y el ovocito, cada una de éstas células tiene funciones específicas durante la foliculogénesis, estereoidogénesis y ovogénesis (35,36). El ovocito se encuentra rodeado por una capa de células de la granulosa, que cambia morfológicamente y prolifera cuando el ovocito inicia el proceso de foliculogénesis, junto con las células de la teca son encargadas de la síntesis de hormonas esteroideas (37). Las células de la teca derivan de células mesenquimales y se dividen en 2 subpoblaciones que se disponen en dos capas, la interna y externa (35). La teca externa está compuesta principalmente por tejido conectivo que rodea y sostiene al folículo antral (38,39) (Figura 3).



**Figura 3. El folículo**

**Diagrama de corte transversal mostrando los componentes celulares de un folículo de Graaf. Adaptado de Erickson GF, (1983).**

Las células de la teca interna presentan receptores a la hormona luteinizante (LH), mientras que las células de la granulosa presentan receptores a la hormona foliculoestimulante (FSH) durante la etapa preantral del desarrollo folicular. LH estimula la producción de andrógenos, mientras que FSH induce la expresión de la enzima aromatasa (P450) para convertir los andrógenos a estrona y 17  $\beta$  estradiol en las células de la granulosa (40,41), a su vez los andrógenos estimulan la acción de FSH en los folículos al incrementar la expresión de sus

receptores dando lugar a la proliferación de P450 por parte de las células de la granulosa y el crecimiento folicular (42–45) (Figura 4).

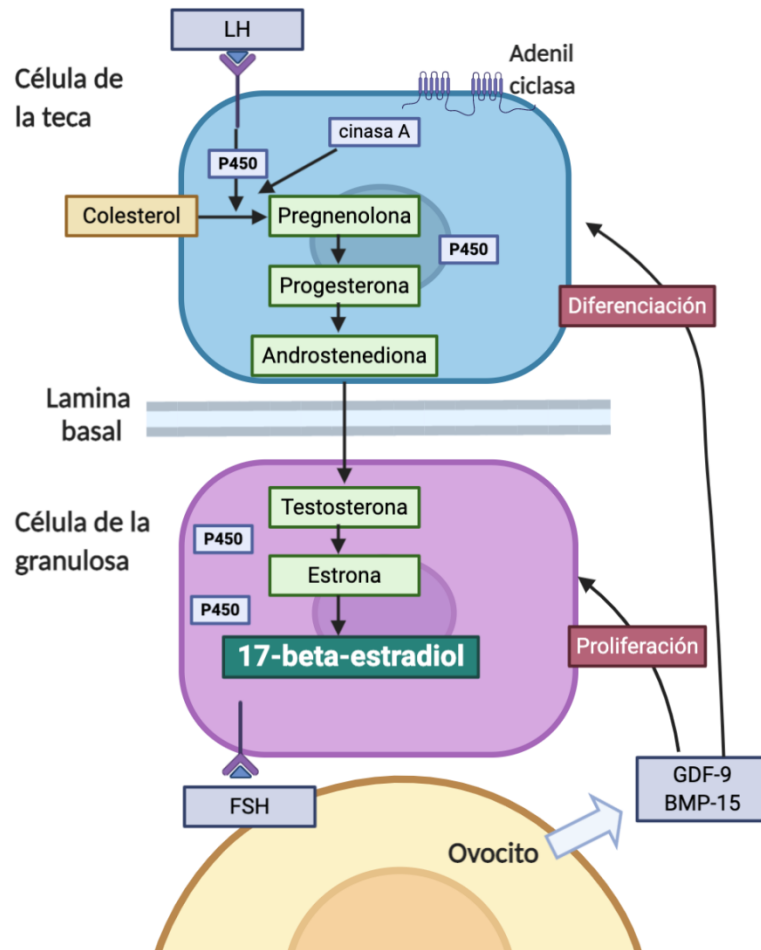


Figura 4. Esteroidogénesis

Comunicación entre las células de la teca, granulosa y ovocito para la producción de E2, modificado de Ketter L et al. (1994).

Asimismo, la interacción entre las células somáticas y el ovocito tiene un rol crítico en el desarrollo folicular, incluyendo su activación, crecimiento y diferenciación (46–49), esta interacción inicia cuando el ovocito produce el factor de crecimiento / diferenciación 9 (GDF-9) que es miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (50,51) y que estimula el reclutamiento, proliferación y diferenciación de las células de la teca, incrementando la expresión de P450; a su vez el GDF-9 estimula la proliferación de las células de la granulosa, así como la expansión de las células del cumulus (CC) (52).

## Ovogénesis y foliculogénesis

Los ovocitos se originan de las células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario a partir del mesodermo, este proceso es regulado por proteínas morfogénicas óseas (BMP) de origen endodérmico como es BMP2 y ectodérmico BMP4, BMP8b (53–55). Las células germinales primordiales migran a la cresta genital donde proliferan por mitosis para formar a las oogonias (56), posteriormente inician su división meiótica, dando lugar a los ovocitos primarios (57). La primera etapa de la meiosis es la profase en la cual se realiza el emparejamiento de cromosomas homólogos y la recombinación del material genético, esta fase está compuesta por las etapas preloteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno, cuando los ovocitos llegan a la etapa de diploteno la primera división meiótica tiene una pausa prolongada llamada dictioteno (58). Durante este periodo inicia la formación de folículos primordiales formados por ovocitos primarios que son rodeados por células somáticas (pre-granulosa) (56).

Los folículos primordiales constituyen el reservorio total de células germinales disponibles durante la vida reproductiva de las hembras (56), estos folículos están constituidos por un ovocito pausado en la etapa de dictioteno de la primera meiosis, una monocapa de células de la granulosa aplanadas y una lámina basal delgada. Los folículos primordiales son reclutados en cohortes para dar lugar a la foliculogénesis, la primera parte de este proceso puede definirse como crecimiento preantral, el cual es independiente de gonadotropinas y durante el cual, ocurre el reclutamiento de un grupo de folículos primordiales, el ovocito crece y se diferencia, además de que se desarrollan los receptores para FSH y LH en las células de la granulosa y de la teca, respectivamente (31,56).

La transición de folículo primordial a primario se encuentra regulado negativamente por la expresión de la hormona antimülleriana (AMH) por parte de las células de la granulosa, este efecto negativo es necesario para mantener el balance entre el número de folículos primordiales reclutados para su transición a folículo primario y los que se mantienen en reservorio (59,60). Morfológicamente la transición de folículo primordial a primario consiste en el cambio de la capa de células de la granulosa de aplanadas a cuboides (61,62), así como

de la activación del genoma del ovocito para que éste inicie su desarrollo (63,64). A diferencia del folículo primordial, el folículo primario expresa receptores para FSH en las células de la granulosa, posee uniones tipo gap entre las células de la granulosa y el ovocito, estas uniones están formadas por proteínas llamadas conexinas (Cx), de las cuales la Cx37 es la más relevante para el transporte de aminoácidos, metabolitos de glucosa y nucleótidos para el crecimiento y funcionamiento del ovocito (49,65), en esta etapa incrementa el número de mitocondrias en el ovocito, lo que refleja el aumento de requisitos energéticos por parte de la célula (66). A partir de la etapa de folículo primario se le conoce como etapa tónica, debido a que el desarrollo folicular depende principalmente de la secreción de gonadotropinas. A pesar de ello, el ovocito regula la función de las gonadotropinas dentro del folículo, por lo tanto, para que se lleve a cabo un desarrollo folicular normal se debe tener una correcta secreción de gonadotropinas, además de un ovocito con adecuado nivel de maduración (67).

El cambio del folículo primario a secundario está regulado por factores producidos por los ovocitos (67), estos factores son GDF-9 que se encarga de la transición de los folículos desde de su etapa primaria (52,68) y BMP-15 que estimula la proliferación de las células de la granulosa, ambos factores son necesarios durante el resto del desarrollo folicular y la ovulación (56). Morfológicamente, el folículo secundario consiste en un ovocito más desarrollado con gránulos corticales formados en el citoplasma, la deposición inicial de la zona pelúcida (ZP) (66), más de dos capas de células de la granulosa y el desarrollo de la capa de células de la teca interna junto con el inicio de la angiogénesis (31).

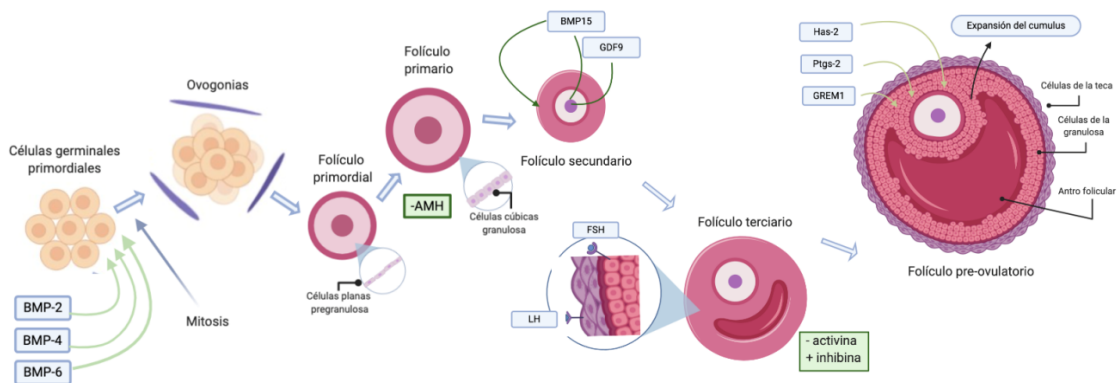
Durante el desarrollo tardío del folículo secundario comienza a acumularse líquido entre las células de la granulosa, dando lugar al antro folicular, las células de la granulosa se diferencian a células del cumulus y células murales, estos cambios dan origen al folículo terciario, también llamado folículo de Graaf (56,69). Los ovocitos en etapa de folículo terciario temprano presentan al menos un nucleolo activo con pequeñas vacuolas (70). Las proteínas que participan en esta etapa son activinas e inhibinas, también pertenecientes a la familia de las TGF $\beta$ ; la activina disminuye conforme la diferenciación de las células de la



granulosa y el desarrollo folicular aumentan, mientras que la inhibina predomina después de la selección folicular y su diferenciación a folículo antral (71,72).

Bajo la influencia de gonadotropinas, los folículos sintetizan hormonas esteroides principalmente andrógenos y estrógenos, los cuales contribuyen al desarrollo folicular induciendo la proliferación y diferenciación de los receptores a andrógenos y a estrógenos, respectivamente (72,73). Una de las funciones principales de las células de la granulosa es la síntesis de estradiol por acción de P450, que a su vez incrementa la respuesta de las células de granulosa a gonadotropinas (74). Durante la etapa antral, el GDF-9 y la BMP-15 regulan la función de las células del cumulus, reduciendo su apoptosis e inhibiendo la producción de progesterona inducida por FSH, evitando así la atresia del folículo y previniendo su luteinización prematura. En estos folículos, el ovocito continúa su crecimiento y presenta modificación, proliferación y redistribución de sus organelos (70).

Finalmente, el folículo preovulatorio contiene un ovocito maduro apto al momento de la ovulación que es inducida por LH. Cuando se presenta el pico de LH el folículo continúa su crecimiento y el ovocito concluye su maduración, la cual está caracterizada por la expansión de las CC y que es promovida por la expresión de los genes hialuronano sintasa 2 (Has2), prostaglandina-endoperoxidasa 2 (Ptgs2) y GREM1 (75) (Figura 5).



**Figura 5. Foliculogénesis y ovogénesis**

**Modificado de: Sánchez F (2012)**

Junto con la maduración del ovocito ocurre la ruptura entre la comunicación de células de la corona radiada y la membrana del ovocito (70), dando lugar a la liberación del COC, en esta etapa los cromosomas del ovocito se condensan y progresan a la etapa final de la meiosis I para detenerse en la metafase II (MII) (66,76). Posterior a la ovulación, las células de la granulosa y de la teca se diferencian a células lúteas, dando origen al CL encargado de la producción de progesterona (P4) (77).

### **Maduración del ovocito**

El ciclo celular meiótico de los ovocitos inicia durante la etapa fetal, en la que se detiene en la fase de diploteno de la profase I y se reinicia al alcanzar la pubertad en respuesta al pico preovulatorio de LH dando lugar a la maduración celular (78).

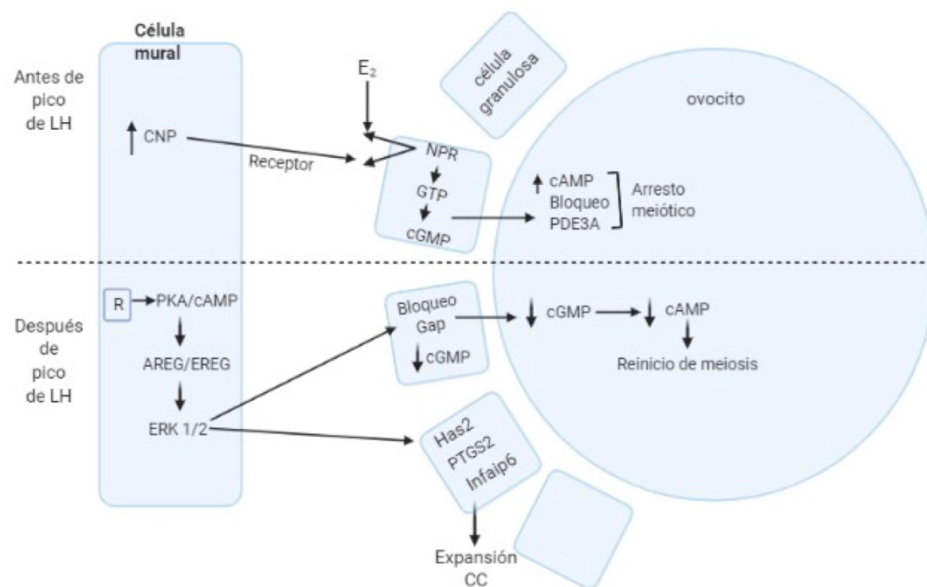
La maduración del ovocito consiste en que el ovocito primario reinicie su división meiótica, la termine e inicie la segunda meiosis hasta la metafase II (MII), esta maduración se divide en nuclear y citoplasmática. La maduración nuclear inicia con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y requiere de la activación de síntesis de proteínas. *In vivo*, el pico de LH es la señal para iniciar la maduración y la GVBD, que es caracterizada por la condensación gradual de la cromatina y la desintegración de la membrana nuclear, estos procesos son regulados por el factor promotor de la maduración (MPF) y la proteína cinasa activada por mitógeno (ERK1/2) (79).

Por otra parte, la maduración citoplasmática incluye aquellos eventos que otorgan al ovocito la capacidad de completar la maduración nuclear, la fertilización y la embriogénesis temprana. En términos generales, implica modificación del citoesqueleto, la acumulación de ARNm, síntesis de proteínas, sustratos y nutrientes que se requieren para lograr que los ovocitos tenga la capacidad de ser fertilizado y dar lugar a un embrión viable (78–80).

### **Factores involucrados en la reanudación de la meiosis**

La competencia meiótica se refiere a la capacidad del ovocito para reiniciar la meiosis, esta competencia es adquirida en una etapa temprana cuando el ovocito aún no ha alcanzado su desarrollo, por lo tanto, debe mantenerse en etapa de vesícula germinal (VG) hasta completar

su maduración (56). Los ovocitos se mantienen en esta etapa debido a los altos niveles intracelulares de adenosin monofostato cíclico (cAMP), el cual es enviado al ovocito por parte de las CC a través de las uniones gap (81). La interacción entre el precursor del péptido natriurético C (CNP), producido por las células murales, y su receptor (NPR2) presente en las CC, induce la conversión de guanosin 5' trifosfato (GTP) a guanosin monofostato cíclico (cGMP), que también es transferido al ovocito por uniones gap. El cGMP previene la activación de la fosfodiesterasa (PDE3) en el ovocito inhibiendo la hidrólisis de cAMP, manteniendo sus niveles elevados (82). Cuando se da el pico preovulatorio de LH se estimula la activación de la proteína cinasa A (PKA) la cual induce péptidos similares al factor de crecimiento epidermal (EGF-like) que activan a ERK1/2, el cual bloquea la comunicación entre el ovocito y las células de cumulus, ocasionando una disminución en los niveles de cGMP y por lo tanto de cAMP (83). A su vez ERK1/2 estimula la expresión de las enzimas Has2, Ptx3 y Tnfaip6 para la producción de ácido hialurónico que activa la expansión de las CC (84–86) (Figura 6).



**Figura 6. Factores para la activación de la meiosis**

**Modificado de Sánchez F. (2012).**

### **Complejo células del cumulus – ovocito (COC)**

La VG presente en los folículos antrales contiene factores reguladores de la función de las CC (87), antes del pico de LH los ovocitos son los encargados de estimular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa a células del cumulus y a células murales (88,89), además de regular la actividad metabólica en el COC. Las uniones gap para la comunicación y transporte de aminoácidos y metabolitos en el COC, son formadas por conexinas (Cx), las Cx más importantes entre las células de la granulosa es la Cx43 y entre las células de la granulosa y el ovocito es la Cx37 (90,91).

La expansión de las células del cumulus se denomina mucificación y el inicio de su formación/expansión depende de la estimulación de gonadotropinas y de señales paracrinadas por el ovocito, principalmente por la secreción de factores facilitadores de la expansión del cúmulo (CEEFs) como son el GDF-9 y la BMP-15, que actúan a través de segundos mensajeros SMAD2/3 y SMAD1/5/8 facilitando la respuesta a gonadotropinas. La mucificación y expansión de las CC en respuesta al pico de LH en la maduración *in vivo*, es absolutamente necesaria para la ovulación y la fecundación, y por lo tanto, es el principal indicador morfológico de maduración del ovocito (56,92,93).

### **Endocrinología reproductiva**

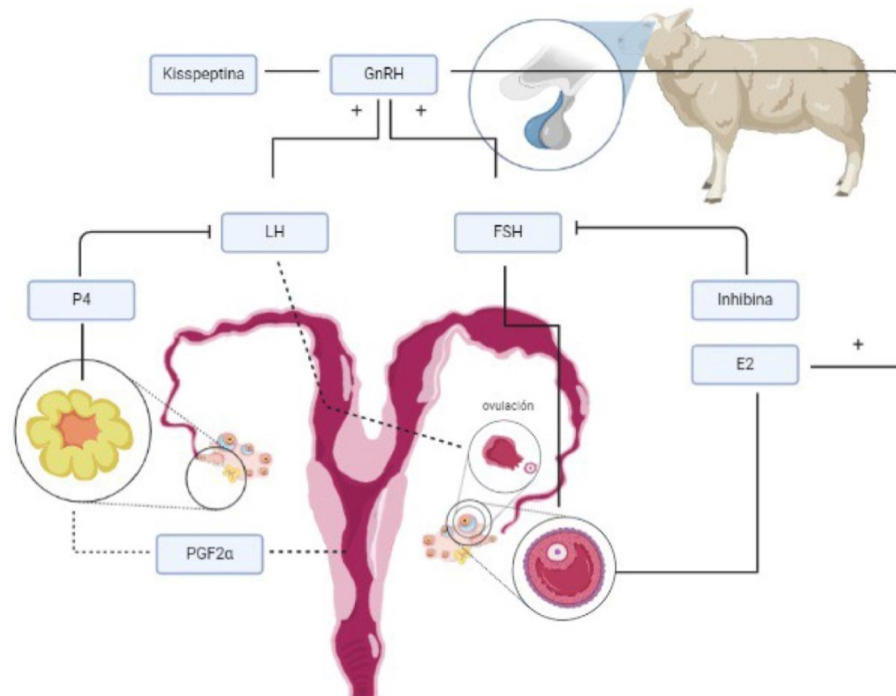
El sistema reproductivo está conformado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Figura 7), así como los tejidos blanco de las hormonas esteroideas secretadas por las gónadas (94).

Los eventos reproductivos en mamíferos son controlados a través de la liberación de LH y FSH por parte de la adenohipófisis, en respuesta a la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo (94). El centro tónico mantiene un patrón de secreción constante de GnRH, mientras que el centro cíclico presente únicamente en las hembras, es responsable del pico de LH en respuesta a un incremento de las concentraciones de E2. A su vez, la secreción de GnRH es modulada por kisspeptina de manera positiva, mientras que la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) actúa directamente sobre los

gonadotropos inhibiendo la secreción de LH y FSH, e indirectamente a nivel hipotalámico sobre las neuronas GnRH (94).

Las gonadotropinas a su vez estimulan la producción de proteínas, factores de crecimiento y hormonas en las gónadas, dentro de estas últimas, estimulan la producción de esteroides (estrógenos, progesterona y testosterona) que regulan a su vez la producción de LH y FSH, así como el comportamiento reproductivo de los animales. En el ovario, la LH induce el desarrollo final y ovulación del folículo dominante, así como la formación del CL que producirá P4; por su parte, la FSH lleva a cabo el reclutamiento de los folículos y estimula su crecimiento (38).

Otras hormonas importantes para la reproducción son producidas por el útero, como la prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), que mantiene la ciclicidad reproductiva del animal por su acción luteolítica sobre el CL (94).



**Figura 7. Eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal**

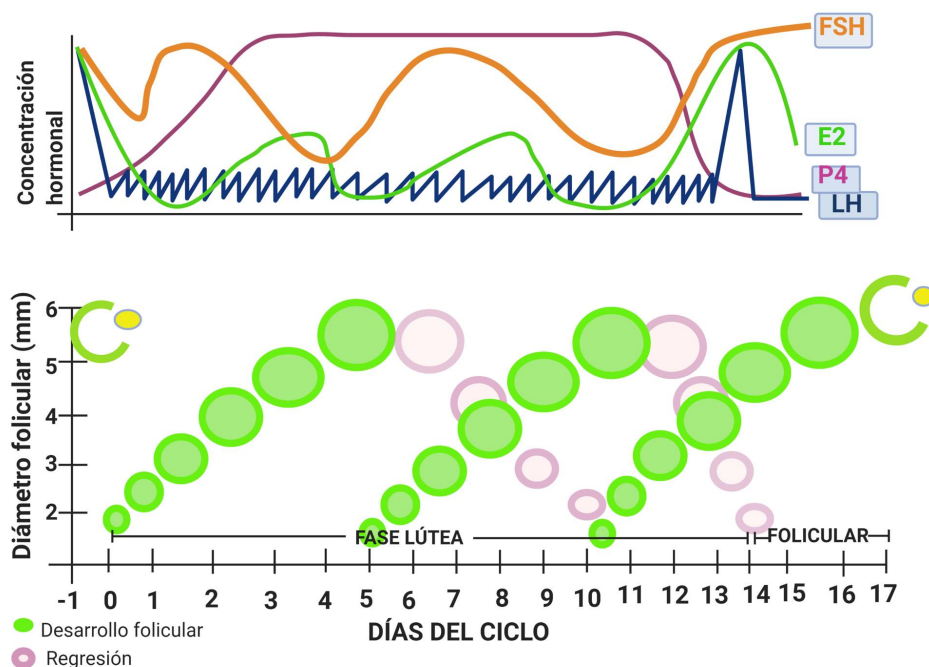
**Modificado de: Crowe M (2016).**

## Ciclo estral

La actividad reproductiva de las ovejas durante el año, se divide en una época reproductiva que ocurre durante los días cortos y la presentación de un anestro estacional que se da durante los días largos (10,95,96). El ciclo estral está asociado a una secuencia de eventos endócrinos regulados por la producción hipotalámica de GnRH, la secreción FSH y LH por la adenohipófisis, el desarrollo de folículos antrales que producen E2 e inhibina, el CL que secreta progesterona y oxitocina, y la secreción de PGF2 $\alpha$  por parte del endometrio (97).

El ciclo estral se divide en una fase folicular; en la cual se lleva a cabo el reclutamiento de nuevos folículos que se desarrollan y maduran para dar lugar a la ovulación (98). Inicialmente los folículos antrales son expuestos a estimulación de FHS y LH, el proceso del desarrollo de los folículos candidatos a ovulación se conoce como reclutamiento, posteriormente uno a tres folículos continúa su maduración mientras que los demás degeneran, a este proceso se le llama selección y como consecuencia uno o más de estos folículos se vuelve dominante (99).

Y en una fase lútea, en la que ocurre la luteinización del folículo ovulado para formar el CL, que durante esta fase tiene su mayor funcionalidad y subsecuente regresión cuando la hembra no está gestante (Figura 8) (38,99), durante esta fase hay crecimiento folicular, sin embargo, no ocurre la ovulación (25).



**Figura 8. Oleadas foliculares y niveles hormonales durante el ciclo estral de la oveja.**

Modificado de Bartlewski et. al (2011).

A su vez, el ciclo se divide en cuatro etapas; proestro, estro, metaestro y diestro. El proestro dura 2 días en promedio e inicia cuando las concentraciones de P4 del ciclo anterior disminuyen a niveles basales debido a la regresión del CL. Durante esta etapa las concentraciones de E2 aumentan simultáneamente con el desarrollo del folículo dominante (100).

Conforme el ciclo avanza hacia el estro, que en la oveja dura 30 horas en promedio, los folículos más grandes de la oleada folicular inducida por FSH comienzan a producir más E2. El hipotálamo secreta GnRH que resulta en un pico de LH producido por la hipófisis. El pico

de LH ocurre 9 horas después de iniciado el estro, durante esta etapa se presenta el comportamiento de receptividad sexual de la oveja debido a que el E2 alcanza sus máximos niveles y en conjunto con LH, inducen la ovulación. Las ovejas ovulan a las 14 a 26 horas después del pico de LH (25,38).

Después del estro, la hembra entra en la etapa de metaestro que dura de 3 a 5 días, los niveles de E2 empiezan a disminuir y las concentraciones de P4 se incrementan debido a su síntesis en el CL, el cual se forma en el ovario en el lugar donde ocurre la ovulación. La estructura inicial que se forma para dar lugar al CL es el cuerpo hemorrágico (CH), que durante esta etapa alcanza aproximadamente los 6 mm de diámetro (38,101).

A partir del día 3 y hasta el día 7 post-ovulación el CL incrementa la producción y secreción de P4 alcanzando sus máximos niveles, mientras que el E2 presenta sus niveles más bajos, posteriormente las concentraciones plasmáticas de P4 se mantendrán constantes hasta el día 12 (102) .

El CL del ciclo estral de la oveja se forma principalmente por la acción de LH, la cual desencadena una cascada de cambios funcionales en las células de la teca y de la granulosa de los folículos (103). El CL alcanza su tamaño máximo (11-14mm) durante el diestro (101) y si la hembra está gestante, el CL se mantiene por el reconocimiento materno de la gestación; de no ser así, ocurre la luteólisis del CL y la hembra entra en proestro, las concentraciones de P4 disminuyen, se desarrolla una nueva oleada folicular y se incrementan los niveles de E2 (38).

La regresión del CL ocurre abruptamente entre los días 12-15 después de la ovulación y en rumiantes, el factor luteolítico que desencadena este evento es la  $PGF2\alpha$ , la cual es secretada por las glándulas endometriales del útero (104,105). Al final del diestro, el E2 folicular estimula la síntesis y secreción de  $PGF2\alpha$  y promueve la formación de receptores a oxitocina en el endometrio (105). La oxitocina regula la secreción de  $PGF2\alpha$  al establecerse una retroalimentación positiva entre ambas hormonas y que finalmente termina con la lisis del CL (106).



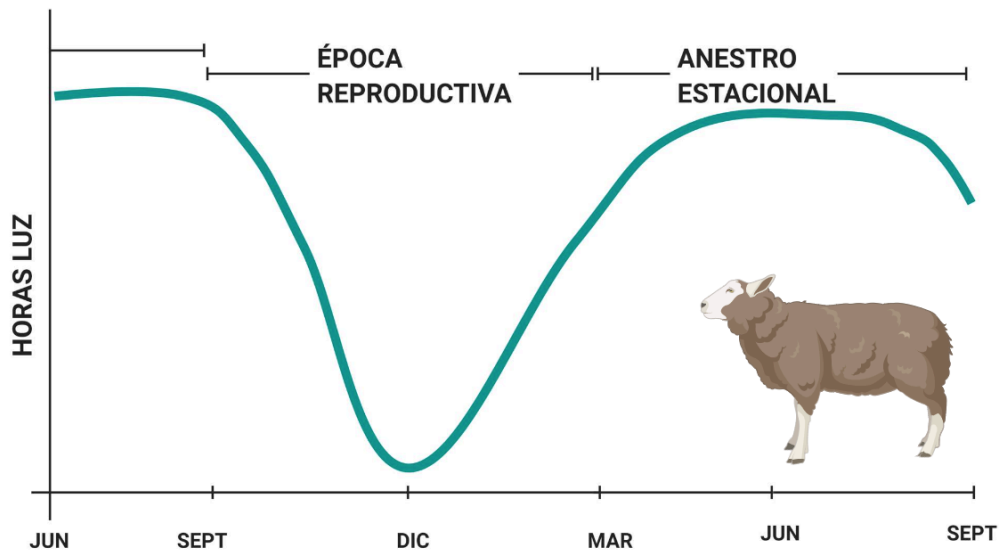
<b>Etapa</b>	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
<b>Duración</b>	2 días	15-45 h	3-5 días	7-10 días

**Cuadro 1. Duración de las etapas del ciclo estral en ovinos.**

(Bartlewski et. al, 2011)

## **Estacionalidad reproductiva en la oveja**

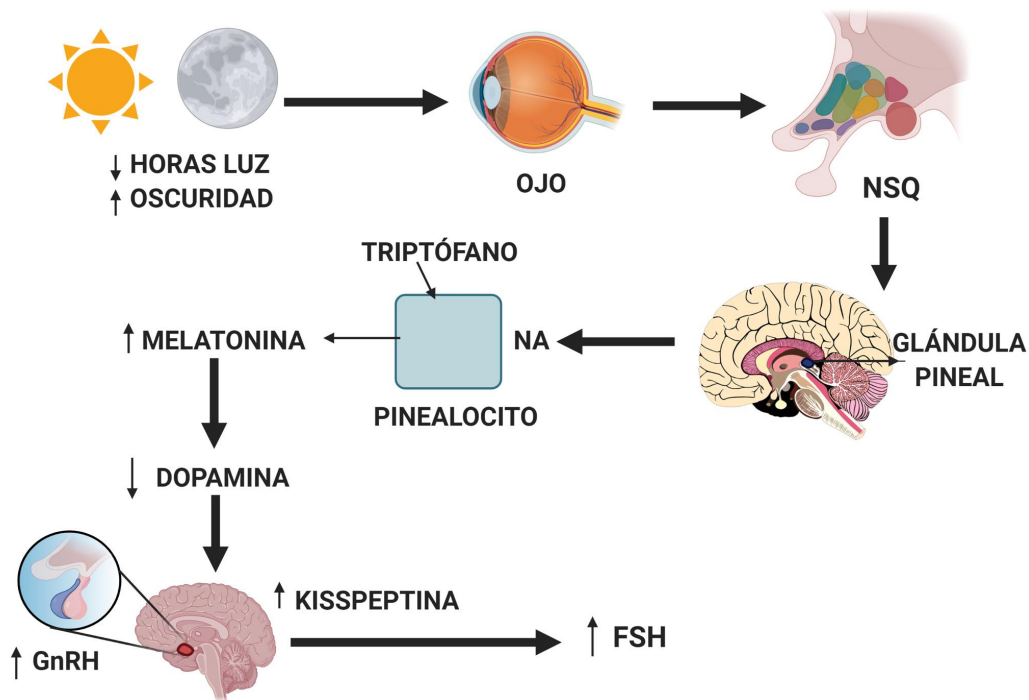
El anestro es una condición ocasionada por diferentes factores como son la gestación, lactación, estrés, patologías y estacionalidad (38). El anestro por estacionalidad reproductiva es un mecanismo de adaptación desarrollado como estrategia para minimizar el impacto negativo del ambiente en la supervivencia de las crías (6). En la oveja, la estacionalidad se caracteriza por cambios endócrinos, ováricos y de comportamiento, que definen dos periodos: una época reproductiva durante los días cortos, en la que se presentan intervalos regulares y sucesivos de comportamiento de receptividad sexual y la ovulación, y un anestro estacional durante días largos, en el que cesa la actividad reproductiva (Figura 9) (38,95).



**Figura 9. Ciclo anual reproductivo en ovinos**

**Calendario anual esquematizando el incremento de horas luz durante la época de anestro en los meses de marzo a septiembre, y la disminución de horas luz durante la época reproductiva en los meses de octubre a febrero.**

La estacionalidad está regulada ambientalmente por el fotoperiodo, el cual permite determinar el momento óptimo para la reproducción (6). Los ovinos detectan las variaciones anuales en la duración del fotoperiodo a nivel central y transforman la señal de la luz en una señal hormonal a través de la síntesis y secreción de melatonina (9,107–110), en este proceso la luz es captada por la retina del ojo, el hipotálamo capta la señal en el núcleo supraquiasmático (NSQ) transformándola en una señal química para la liberación de noradrenalina (NA), la cual es captada por receptores alfa y beta adrenérgicos en la membrana celular de los pinealocitos de la glándula pineal, induciendo la síntesis de la N-acetil-transferasa, enzima necesaria para la producción de melatonina a partir del triptófano (Figura 10) (6).



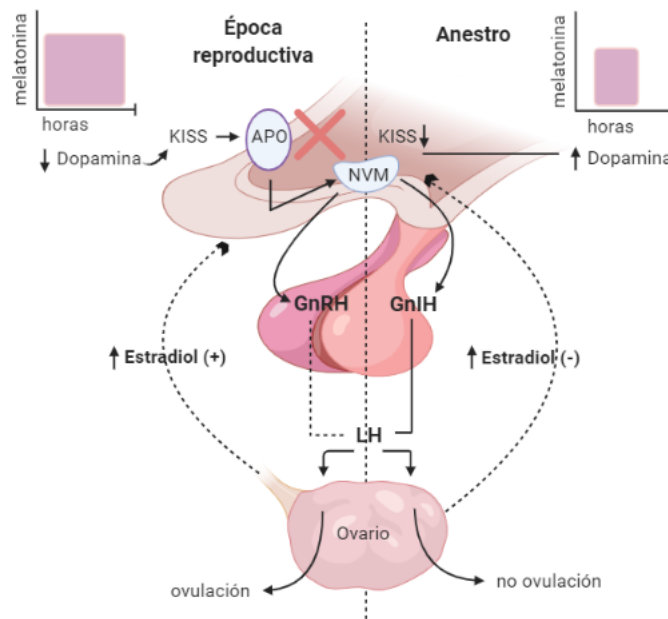
**Figura 10. Síntesis de melatonina**

**Esquema del proceso de síntesis de melatonina a partir de la disminución en la cantidad horas luz, y sus efectos sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.**

En los pequeños rumiantes la amplitud en la secreción de melatonina durante los días con menos horas luz es interpretada como una señal inductora de la reproducción, estimulando la secreción pulsátil de GnRH y provocando una disminución en la sensibilidad hipotalámica al efecto de retroalimentación negativa de E2 (111), a su vez la duración de la secreción de melatonina regula la secreción de dopamina, a menor duración en la secreción de melatonina durante los días largos se induce la síntesis de dopamina ocasionando el anestro estacional, mientras que, durante los días cortos la mayor duración en la síntesis y secreción de melatonina inhibe la producción de dopamina, con el subsecuente restablecimiento de la actividad estral y la ovulación (108,109).

El control de la secreción de GnRH como consecuencia de la regulación por el fotoperiodo está mediado por las neuronas de kisspeptina (112,113) en respuesta al estímulo de dopamina sobre estas neuronas (114). Existen dos poblaciones de neuronas kisspeptina que regulan la

función esteroidea de las gónadas, una es la población en el núcleo arcuato (ARC) que median la retroalimentación negativa, la otra es la población del núcleo anteroventral periventricular (AVP) necesaria para la retroalimentación positiva de E2 sobre GnRH y por lo tanto el pico de LH, en ovinos estos cambios en la secreción de GnRH se dan en respuesta a E2, que durante el anestro estacional tiene una retroalimentación negativa sobre GnRH, mientras que en época reproductiva actúa positivamente en la secreción de GnRH. (8,107,115,116) (Figura 11).



**Figura 11. Comparación en la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación de estradiol.**

Adaptado de Arroyo (2010).

## Reproducción asistida en ovinos

Para aumentar la productividad en la industria de pequeños rumiantes, es necesario mejorar la selección y el potencial genético de estos animales. Entre las técnicas reproductivas más comunes para este fin, se encuentra la inseminación artificial (IA) que permite acelerar el mejoramiento genético a partir del aprovechamiento de machos seleccionados. Otra de las

técnicas aplicadas, es la producción *in vivo* de embriones que en la actualidad consiste en la superovulación y transferencia de embriones, siendo la principal de las técnicas reproductivas planteadas en los últimos años (117). Por otra parte, la producción *in vitro* de embriones (IVEP), consiste en la maduración y fertilización de ovocitos, cultivo y transferencia de embriones, la IVEP puede realizarse a partir de ovocitos recuperados por laparoscopia directamente de ovarios de ovejas tratadas o no hormonalmente, o bien postmortem, recuperando las células de ovarios de animales de rastro, sin embargo, estos procesos siguen siendo ineficientes en ovinos. Aproximadamente entre el 50 y 70% de los ovocitos que se someten a IVM alcanzan la maduración, del 50 al 80% de los ovocitos que son fertilizados *in vitro*, sólo el 20-50% llega a la etapa de clivaje, de los cuales del 20-50% alcanzan la etapa de blastocisto al día 7 a 8 (11,118).

El proceso para la producción *in vitro* de embriones utiliza técnicas necesarias para desarrollar otras biotecnologías como la clonación, además se han propuesto como una estrategia valiosa para la conservación de especies en peligro de extinción. Por otra parte, dan acceso a investigaciones fundamentales sobre el ciclo celular y las regulaciones de la expresión génica no sólo en ovinos, sino como modelo animal para investigaciones biotecnológicas aplicables en medicina humana u otras especies. Estas técnicas reproductivas son extremadamente versátiles, por lo que se han estudiado intensamente en los últimos años, sin embargo, las tasas de éxito aún están lejos de las que se obtienen *in vivo* (119–121), y por ello resulta necesario encontrar soluciones para mejorar los resultados adquiridos con estas tecnologías.

### **Maduración de ovocitos *in vitro***

Para que los ovocitos adquieran su capacidad de ser fertilizados, deben pasar por el proceso de maduración nuclear y citoplasmática, proceso en el cual liberan su primer cuerpo polar y llegan a MII (122). La IVM se realiza en ovocitos recuperados de folículos preantrales antes de alcanzar las etapas de selección y dominancia (2) y es un paso clave para la obtención de ovocitos de buena calidad que puedan ser fertilizados. A pesar de que se han utilizado diferentes medios de maduración, el medio comúnmente utilizado en pequeños rumiantes es el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM199) amortiguado con sales de Earle, este medio

provee fuentes de energía, carbono, aminoácidos, vitaminas, minerales y es comúnmente adicionado con piruvato, l-glutamina, factores de crecimiento y hormonas como FSH y LH (3,120,123).

*In vivo*, la maduración de ovocitos ocurre por mecanismos endócrinos del eje hipotálamo-hipofisis-gónada y por reguladores locales autocrinos o paracrinos que actúan a nivel folicular. *In vitro*, la adición de hormonas gonadotrópicas exógenas a los medios de maduración incrementa el número de ovocitos que alcanzan la MII, por lo que se han utilizado diferentes fuentes de hormonas gonadotrópicas en la IVM de ovocitos de ovejas, como FSH, LH, gonadotropina coriónica equina (eCG) o humana (hCG) y E2 (124).

Otro suplemento común en los medios de maduración son los sueros, como el suero ovino, suero fetal bovino (FBS) o suero humano, estos sueros contienen sustancias benéficas para el desarrollo de embriones de ovocitos madurados *in vitro*, como son factores de crecimiento y componentes que favorecen la expansión de las CC, sin embargo, estos sueros contienen una concentración variable de moléculas que siguen sin identificarse (125).

Por su parte, la relación entre el ovocito y el folículo se lleva a cabo por las CC que forman proyecciones hacia la ZP y proveen una ruta de comunicación intercelular entre las células somáticas y el ovocito, además de que proveen nutrientes y energía al ovocito para estimular la VGBD y el desarrollo a MII (5), por sus funciones, el grado de expansión de las CC puede ser utilizado como un indicador morfológico de la maduración del ovocito al igual que la presencia del primer cuerpo polar, ya que es un indicador de la maduración nuclear y citoplasmática (79).

### **Suero fetal bovino (FBS)**

El suero corresponde a la parte líquida de la sangre sin células, plaquetas ni factores de coagulación. Para la producción de cultivos celulares *in vitro*, como el cultivo de fibroblastos, células madre mesenquimales, células MDCK, MDBK, VERO y ovocitos, es común utilizar FBS como suplemento, el cual se extrae de la sangre de fetos de hembras gestantes que llegan

a rastro por término de su vida productiva o por afectaciones de salud no infecciosas (126). (14,127–129). EL FBS contiene hormonas, vitaminas, proteínas de transporte y factores de crecimiento, estos últimos tienen un papel importante en la regulación de la maduración de los ovocitos, particularmente a través de las CC (Cuadro 2).

En la IVM, el FBS favorece la expansión de las CC, previene el endurecimiento de la ZP debido a que proporciona factores hormonales que estimulan el crecimiento y la proliferación celular, activa proteínas de transporte para hormonas y tiene propiedades antioxidantes (15,17,130), por lo anterior, utilizar medios suplementados con FBS reduce la necesidad de dedicar tiempo y esfuerzo a desarrollar una formulación de medio optimizada y específica para cada tipo celular, pero también por esta razón tiene la desventaja de contaminarse con agentes biológicos (17).

<b>Componente</b>	<b>[ ] / 100 ml</b>	<b>Rango</b>
<b>Proteína total</b>	3.8 g	3.2 - 7
<b>Albumina</b>	2.3 g	2 - 3.6
<b>Endotoxina</b>	0.36 ng / ml	0.01 - 10
<b>Hemoglobina</b>	11.3 mg	2.4 - 18.1
<b>Colesterol</b>	31 mg	12.0 - 63
<b>Glucosa</b>	125 mg	85 - 247
<b>Insulina</b>	10 uU/ml	6.0 - 14
<b>PGE</b>	5.91 ng / ml	0.5 - 30.5
<b>PGF</b>	12.33 ng / ml	3.8 - 42

**Cuadro 2. Composición del suero fetal bovino**

### **Desventajas del FBS**

Existen diversos problemas relacionados con la suplementación del FBS en los cultivos celulares, uno de ellos es que puede interferir con la estabilidad celular genotípica al aumentar la presencia de puentes nucleoplasmáticos que conllevan a la muerte celular por apoptosis, kariólisis, picnólisis y necrosis (130,131). El FBS puede suprimir la propagación celular y diferenciación de los tejidos en IVC de embriones de ratones (132), además de que puede estar contaminado con bacterias, micoplasmas, levaduras, hongos, inmunoglobulinas,

endotoxinas y virus, de hecho se ha reportado que el 50% de FBS comercial, resulta positivo a alguno o más de los siguientes virus; diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), parainfluenza 3 (PI3), rabia, reovirus 3 (REO3), adenovirus bovino (BAV), parvovirus bovino (BPV), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), entre otros (133). Estas sustancias no deseadas pueden afectar los experimentos científicos y la producción masiva de proteínas (130). Por tanto, los aspectos de seguridad, científicos y éticos son incentivos para desarrollar y utilizar medios libres de FBS.

## **Jalea Real**

Durante los últimos años se ha incrementado la aplicación de productos apícolas como la miel, el polen, el propóleo y la jalea real (JR) en la medicina. Actualmente, muchos estudios están dirigidos a investigar sus propiedades farmacológicas debido a su eficacia (20).

La JR es una secreción viscosa de color amarillo-blanquecina (134,135) producto de la secreción de las glándulas hipo-faríngeas y mandibulares de las abejas obreras productoras de miel (*Apis mellifera*) (21,22), se le han atribuido muchas actividades farmacológicas, como efectos antibacterianos, antitumorales, antiinflamatorios e inmunomoduladores.

### **Propiedades de la jalea real**

La jalea real (JR) es un material viscoso parcialmente soluble en agua con una densidad de 1.1g/ml. Es una fuente rica en proteínas (27-41%), aminoácidos esenciales, carbohidratos (30%), ácidos grasos lipídicos (8-19%), fitoesteroles, carotenos, flavonoides, vitaminas y minerales (20). Los aminoácidos predominantes en la JR son lisina, fenilalanina, serina, prolina, aspartato, arginina, cisteína y ácido glutámico (136), contiene diferentes componentes como péptidos, acetilcolina y hormonas (gonadotropinas, prolactina, testosterona, estradiol y progesterona) (134). Es rica en minerales como hierro, potasio, ácido fólico, tiamina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina y betacarotenos (20). Los lípidos representan del 3% a 19% del peso seco de la JR (136) y son los segundos compuestos bioactivos más importantes después de las proteínas, su composición lipídica consta de



ácidos grasos, lípidos fenólicos, fosfolípidos y esteroides (137). Por otra parte, posee carbohidratos como la fructosa, glucosa y sacarosa (Cuadro 3) (134).

Componente	[ ] mg/100g
<b>Proteína total</b>	27-41%
<b>Carbohidratos</b>	30%
<b>Ácidos grasos</b>	8-19%
<b>Glucosa</b>	3.4-7.7%
<b>Fructosa</b>	2.3-7.8%
<b>Potasio</b>	200-1000
<b>Magnesio</b>	20-100
<b>Hierro</b>	1.0 - 11
<b>Zinc</b>	0.7-8
<b>Cobre</b>	0.33-1.6
<b>Tiamina</b>	0.1-1.7
<b>Riboflavina</b>	0.5-2.5
<b>Niacina</b>	4.5-19
<b>Ácido pantoténico</b>	3.6-23
<b>Piridoxina</b>	0.2-5.5
<b>Biotina</b>	0.15-0.55

**Cuadro 3. Composición química de la jalea real**

### **Uso de jalea real en reproducción**

Numerosas investigaciones afirman impactos positivos de la JR sobre la eficiencia reproductiva y la regulación hormonal de los animales (138,139). La JR tiene una acción estrogénica similar a las hormonas esteroides exógenas que actúan sobre receptores específicos de tejidos reproductivos (139) con efectos *in vivo* e *in vitro* similares a los producidos por 17 beta-estradiol (E2) (21,22), adicionalmente a su composición estrogénica, se ha reportado que la JR posee gonadotropinas y aminoácidos esenciales que aumentan la actividad enzimática para la síntesis de ácido hialurónico, el cual es necesario para la expansión de las CC (24). Otra característica relevante del uso de JR en la reproducción son sus propiedades antioxidantes, que protegen los gametos masculinos y femeninos al reducir la expresión de marcadores moleculares asociados al estrés oxidativo (140), en un estudio se

comprobó que la administración de JR por vía muscular en ovejas tiene un comportamiento similar al producido por la gonadotropina coriónica equina (eCG) durante la sincronización de estros, sugiriendo que este efecto de la JR es debido a su rico contenido nutricional y hormonal, capaz de ejercer una acción directa en la función ovárica (141).

Las propiedades de la JR en reproducción se han comprobado experimentalmente en el incremento en la tasa de maduración de ovocitos en cabras (23), como alternativa del uso de progestágenos para la sincronización de estros en cabras (156) y se ha reportado un efecto positivo en la respuesta a estros, el porcentaje de gestación y parición al administrarse por vía muscular en ovejas (142). Adicionalmente, aumenta la capacidad de congelación espermática en búfalos (24), disminuye la infertilidad estacional en conejos (18,19) y por su composición química especialmente aminoácidos, minerales (Ca, K, Mg, Na) y vitaminas (C y E), juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares (143).

Por todo lo anterior descrito, en este trabajo se evaluará la tasa de maduración de ovocitos de oveja utilizando JR como sustituto del FBS en ovocitos colectados durante la época reproductiva y el anestro estacional.

## **JUSTIFICACIÓN**

La IVM es el primer paso dentro de las tecnologías reproductivas para la IVEP, en los últimos años se ha adoptado a la IVEP como una herramienta para el mejoramiento del valor genético y de la eficiencia reproductiva en la producción animal especialmente en bovinos, además de emplearse para la preservación de especies en peligro de extinción. Sin embargo, aún existe alta variabilidad en los resultados de estas tecnologías y se hace necesario optimizar los procedimientos para mejorar la respuesta en otras especies de importancia productiva y económica como son los pequeños rumiantes. En diferentes biotecnologías, incluyendo la IVM, se ha empleado el FBS como un suplemento para promover el crecimiento y

proliferación celular, sin embargo, su uso es motivo de controversia debido a la variabilidad en su composición entre lotes, el desconocimiento de todos sus componentes y la falta de claridad del efecto que tiene cada uno en las células, asimismo, es altamente probable que los lotes de FBS estén contaminados por agentes biológicos y que su método de colección represente un conflicto ético. Como consecuencia de lo anterior es preciso desarrollar estrategias para reducir o reemplazar el FBS en los medios de cultivo celulares, lo que nos exige encontrar fuentes accesibles que proporcionen los nutrientes que el FBS ofrece. Dentro de la salud humana y animal se ha adoptado el uso de JR como antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, antiinflamatorio e inmunomodulador, debido a su composición química rica en proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Se sabe que la JR posee hormonas esteroides y gonadotropinas que han mejorado la eficiencia reproductiva *in vivo* e *in vitro* en diferentes especies y que son comúnmente adicionadas a los medios para IVM de ovocitos. Se han reportado efectos positivos al implementar la JR en tecnologías reproductivas, incluyendo el incremento en la tasa de maduración al adicionarse a medios convencionales para IVM, además posee propiedades antioxidantes que protegen la integridad de las membranas celulares en gametos femeninos y masculinos, por lo que resulta importante evaluar su uso como un sustituto de los suplementos convencionales, como es el FBS utilizado durante la IVM, considerando las variables que cada modelo animal ofrece, que para el caso de los pequeños rumiantes es la estacionalidad.

## **HIPÓTESIS**

La jalea real de *Apis mellifera* funciona como sustituto del suero fetal bovino en un medio de maduración *in vitro* de ovocitos de ovejas, independientemente de la época reproductiva en la que los ovocitos sean colectados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Comparar la tasa de maduración entre ovocitos de oveja madurados en medio adicionado con jalea real de *Apis mellifera* contra los madurados con suero fetal bovino, colectados durante época reproductiva y anestro estacional.

### **Objetivos específicos**

1. Comparar la tasa de recuperación de ovocitos ovinos obtenidos de ovarios colectados en época reproductiva y anestro estacional.
2. Realizar la maduración *in vitro* de ovocitos de oveja colectados en época reproductiva, en medio adicionando con jalea real de *Apis mellifera* contra FBS.
3. Realizar la maduración *in vitro* de ovocitos de oveja colectados en época de anestro estacional, en medio adicionando con jalea real de *Apis mellifera* contra FBS.
4. Comparar las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja madurados con medio adicionado con JR contra FBS, independientemente de la época en la que los ovocitos sean colectados.
5. Comparar las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja colectados en época reproductiva contra ovocitos colectados en anestro utilizando JR y FBS.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Fases del estudio experimental

El estudio experimental se dividió en dos fases de acuerdo al periodo en que se obtuvieron los ovocitos para su maduración. La primera fase se realizó durante la época de anestro estacional de los ovinos que se presenta entre los meses de febrero a julio (6), el trabajo experimental se llevó a cabo en el mes de marzo y consistió en la colección de ovarios de ovejas sacrificadas en el rastro municipal TIF 412 ubicado en Chichimequillas-El Salitre, Querétaro; la obtención de ovocitos, procesamiento y maduración *in vitro*, se realizó en la Clínica de Reproducción Equina del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (Figura 12-A). La segunda fase se realizó durante la época reproductiva de las ovejas que se presenta en los meses de agosto a enero (6), el trabajo experimental se llevó a cabo en el mes de octubre y consistió en la colección de ovarios de ovejas sacrificados en el rastro municipal TIF 462 ubicado en Fresnillo, Zacatecas, el procesamiento y maduración *in vitro* de los ovocitos, se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad de Posgrado de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas (Figura 12-B).



**Figura 12. Localización de las fases experimentales.**

Localización de los rastros donde se obtuvieron los ovarios de ovejas y los laboratorios donde se llevo a cabo la recuperación de COCs e IVM. A: distancia

entre el rastro TIF 412 y la CRE, ambos ubicados en Qro. B: distancia entre el rastro TIF 462 y la Unidad de MVZ, ambos ubicados en Zacatecas.

### **Obtención y transporte del material biológico:**

Se obtuvieron los ovarios de 25 y 23 ovejas en la primera y segunda fase experimental, respectivamente. Una vez obtenidos los ovarios del rastro, éstos fueron transportados al laboratorio 1 a 2 horas después de su colección, en un termo de plástico con capacidad de 1 litro a temperatura de 37° C y en agua potable adicionada con 100µg/ml de estreptomicina y 100 UI/ml de penicilina.

### **Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos**

#### **Caracterización del material biológico**

En el laboratorio los ovarios fueron lavados 3 veces con solución salina fisiológica al 9% a 37°C para retirar los restos de sangre y adicionalmente se retiró el exceso de tejido.

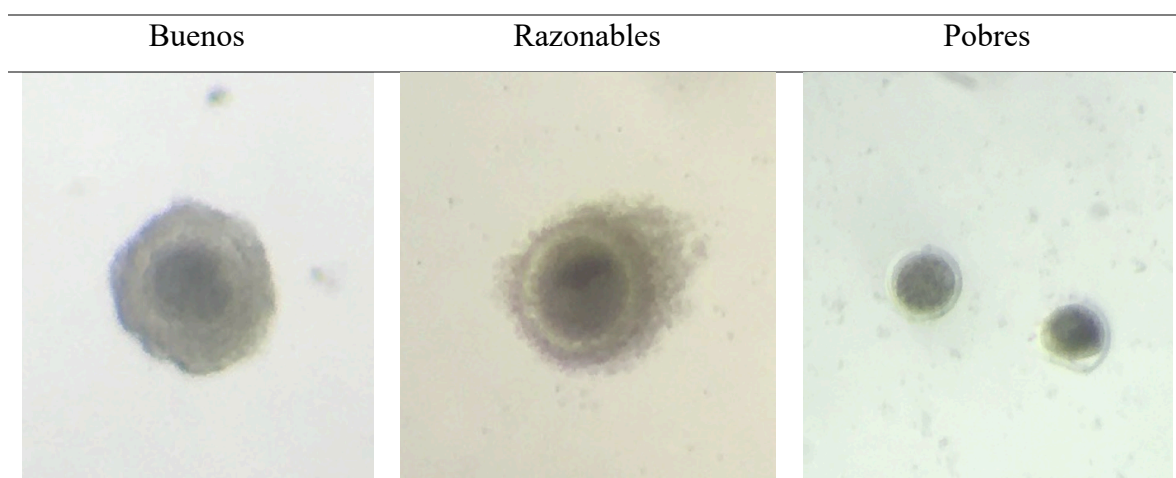
Para la selección del material biológico se emplearon dos criterios; el primero fue la época del año en el que se colectó el material, definiendo la época reproductiva en el mes de octubre y al anestro estacional a finales de marzo. Adicionalmente se seleccionó el material que mostró características morfológicas correspondientes a cada época, delimitando que los ovarios que presentarán cuerpo lúteo y folículos en diferentes estados de desarrollo correspondían con época reproductiva, mientras que aquellos ovarios sin cuerpo lúteo y con folículos pequeños fueron delimitados como correspondientes a anestro estacional. Los ovarios que no cumplieron con los criterios fueron descartados.

#### **Obtención de ovocitos ovinos**

Para la colección de ovocitos se empleó la técnica de disección, ya que permite obtener el complejo *cumulus* ovocito con una mejor calidad en comparación con otras técnicas (144,145), dicha técnica consiste en diseccionar los folículos con un tamaño de 2 a 6 mm

utilizando tijeras quirúrgicas estériles y colectarlos en medio de recuperación TCM 199 con sales de Hanks a 35° C adicionado con 50µg/ml de gentamicina y 10 UI/ml de heparina (Figura 10), una vez diseccionados los folículos, se lavaron tres veces con medio de recuperación para retirar los detritus celulares.

Para la obtención de los ovocitos los folículos fueron reventados en una caja de Petri y lavados con medio de recuperación y posteriormente los complejos ovocito-células del cumulus (COCs) fueron seleccionados utilizando un microscopio estereoscópico. Para la selección de los COCs, se utilizó la clasificación de Wani, 1999. Se calificó a los COCs como buenos, cuando se tenían ovocitos con muchas capas de células del cumulus y un citoplasma uniforme; razonables, cuando aparecían ovocitos con citoplasma uniforme y una capa delgada de células del cumulus o con algunas capas incompletas y pobres, cuando se presentaban ovocitos sin células del cumulus (Figura 13) (146–148). Para el presente estudio sólo los COCs clasificados como buenos y razonables fueron utilizados durante la maduración *in vitro*. Los ovocitos seleccionados fueron separados y depositados en una caja de Petri con medio de recuperación a ~ 35° C.



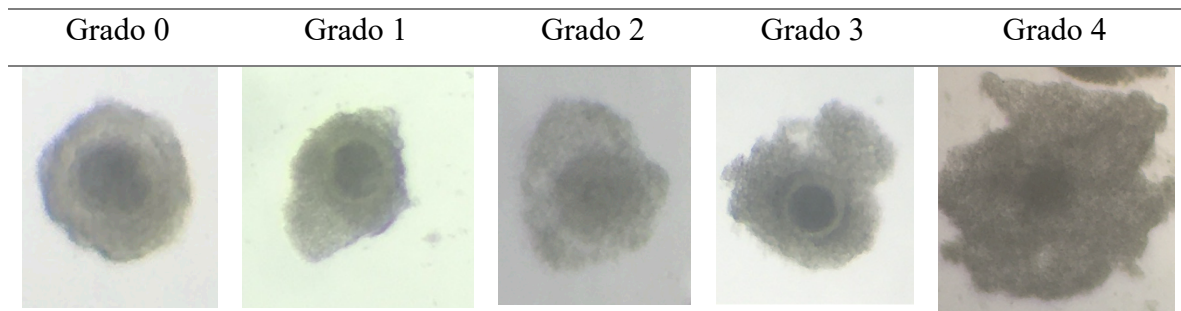
**Figura 13. Clasificación de COCs de ovino de acuerdo a la clasificación de Wani (1999).**



### **Maduración *in vitro***

Para la maduración *in vitro*, los ovocitos seleccionados fueron lavados dos veces en medio de maduración TCM-199 adicionado con sales de Hanks suplementado con 20% (v/v) de piruvato, 0.1µg/ml de FSH y 50µg/ml de gentamicina (149–151). Se realizaron dos grupos de estudio de acuerdo al suplemento adicionado al medio de maduración, el grupo control (FBS) adicionado con 10% (v/v) de FBS y el grupo experimental (JR) adicionado con 10µg/ml de jalea real de *Apis mellifera* (150). Posteriormente fueron incubados en grupos de 5 COCs en gotas de 50µl de medio de maduración (149–151), cubiertas con aceite mineral para cultivo (Sigma-Aldrich elaborado en St. Louis, Missouri). Los grupos se dividieron por tratamiento (FBS y JR), en diferentes tiempos 0, 2, 6, 12 y 27 h, cada uno con 3 replicas. Los grupos de ambos tratamientos fueron incubados a una temperatura de 38°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad relativa.

Después de las 27 horas de maduración, se evaluó el grado de maduración de los ovocitos en el microscopio estereoscópico. El grado de maduración celular se determinó con base al grado de expansión de las células del cumulus en una escala del 0 al 4, de acuerdo a Pawshe (1996). Así, el grado 0, se presentaba sin expansión del COCs; el grado 1, sin expansión, pero las células del cumulus rodeaban homogéneamente al ovocito; el grado 2, cuando sólo las capas más externas de las células del cumulus se expandieron; el grado 3, presentaba expansión de todas las capas celulares del cumulus excepto la corona radiada; en el grado 4, todas las células del cumulus incluyendo la corona radiada se expandieron (Figura 14) (49,152), y se consideraban degradados cuando los ovocitos perdían la continuidad de su membrana o presentaban su citoplasma irregular.



**Figura 14. Grados de maduración de COCs de ovinos, de acuerdo a Pawshe (1996).**

### **Análisis estadístico**

En el presente estudio se midieron las siguientes variables de respuesta en cada grupo por medio de un análisis de varianza (ANOVA):

- **Tasa de maduración con efecto de tratamiento y época:**
  - Utilizando JR en época reproductiva: porcentaje de ovocitos obtenidos en época reproductiva que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en un medio adicionado con JR.
  - Utilizando FBS en época reproductiva: porcentaje de ovocitos obtenidos en época reproductiva que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en un medio adicionado con FBS.
  - Utilizando JR en anestro estacional: porcentaje de ovocitos obtenidos en anestro estacional que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en un medio adicionado con JR.
  - Utilizando FBS en anestro estacional: porcentaje de ovocitos obtenidos en anestro estacional que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en un medio adicionado con FBS.

Para el análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + a_i + a_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- $\gamma$  es la variable respuesta (tasa de maduración).
- $\mu$  es la media global de las observaciones.
- $\alpha_i$  es el efecto del tratamiento (FBS o JR).
- $\alpha_j$  es el efecto de la época del año.
- $\epsilon_{ij}$  es el error aleatorio considerando el tratamiento y la época del año.

• **Tasa de maduración por tiempo:**

- Utilizando JR en época reproductiva: porcentaje de ovocitos obtenidos en época reproductiva que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 2, 6, 12 y 27 horas de incubación en un medio adicionado con JR.
- Utilizando FBS en época reproductiva: porcentaje de ovocitos obtenidos en época reproductiva que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 2, 6, 12 y 27 horas de incubación en un medio adicionado con FBS.
- Utilizando JR en anestro estacional: porcentaje de ovocitos obtenidos en anestro estacional que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 2, 6, 12 y 27 horas de incubación en un medio adicionado con JR.
- Utilizando FBS en anestro estacional: porcentaje de ovocitos obtenidos en anestro estacional que alcanzaron el grado 4 de maduración a las 2, 6, 12 y 27 horas de incubación en un medio adicionado con FBS.

Para el análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \alpha_j + \alpha_k + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- $\gamma$  es la variable respuesta (tasa de maduración).
- $\mu$  es la media global de las observaciones.
- $\alpha_i$  es el efecto del tratamiento (FBS o JR).
- $\alpha_j$  es el efecto de la época del año.
- $\alpha_k$  es el efecto del tiempo de maduración.
- $\epsilon_{ij}$  es el error aleatorio considerando el tratamiento y la época del año.

Se compararon las medias del grado de maduración alcanzado de los COCs en las horas 2, 6, 12 y 27 en todos los grupos experimentales con el análisis estadístico Tukey-Kramer DMSH (diferencia mínima significativa honesta).

Para el análisis Tukey-Kramer DMSH se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$DMSH = q_{k,(n-k)}^{\alpha} \sqrt{\frac{CM_{error}}{2} \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} + \frac{1}{n_k} \right)}$$

Dónde:

- $q_{k,(n-k)}^{\alpha}$  es el grado de libertad del error.
- $CM_{error}$  son los cuadrados medios del error.
- $n_i$  son las repeticiones de los tratamientos (JR o FBS).
- $n_j$  son las repeticiones del factor época del año (ER o AE).
- $n_k$  son las repeticiones del tiempo de maduración (2, 6, 12 o 27 horas).

Asimismo, en el presente estudio se compararon las medias de las siguientes variables por medio de la prueba de t de Student.

- Tasa de maduración por época: porcentaje de ovocitos alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en época reproductiva, en comparación con el porcentaje de ovocitos alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en anestro estacional.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$t = \frac{(x1 - x2)}{SED}$$

Dónde:

- t es la diferencia entre las medias.
  - x1 es la media obtenida para la tasa de maduración en época reproductiva.
  - x2 es la media obtenida para la tasa de maduración en anestro estacional.
  - SED es el error estándar de diferencia entre las medias de muestras.
- Tasa de maduración por tratamiento: porcentaje de ovocitos alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en medio con JR, en comparación con el porcentaje de ovocitos alcanzaron el grado 4 de maduración a las 27 horas de incubación en medio con FBS.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$t = \frac{(y1 - y2)}{SED}$$

Dónde:

- t es la diferencia entre las medias.
  - y1 es la media obtenida para la tasa de maduración con JR.
  - y2 es la media obtenida para la tasa de maduración con FBS.
  - SED es el error estándar de diferencia entre las medias de muestras.
- Tasa de obtención de COCs por ovario: número de ovocitos obtenidos por ovario de rastro en época reproductiva en comparación con el número de ovocitos obtenidos por ovario de rastro en época de anestro.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$t = \frac{(z1 - z2)}{SED}$$

Dónde:

- t es la diferencia entre las medias.
- z1 es la media obtenida para el número de ovocitos obtenidos en época reproductiva.

- $y_2$  es la media obtenida para el número de ovocitos obtenidos en anestro estacional.
- SED es el error estándar de diferencia entre las medias de muestras.

Para todos los análisis los datos fueron transformados a su valor Arcsine para normalizar la distribución de los datos, posteriormente se graficaron los porcentajes de maduración de ovocitos obtenidos.

## RESULTADOS

### Tasa de obtención de ovocitos

Se comparó el promedio de COCs recuperados por ovario en ambas fases experimentales, se obtuvo una media de 3.54 (+/-1) durante la época de anestro y 3.66 (+/-0.7) en la época reproductiva, los análisis estadísticos mostraron que no existe diferencia significativa entre el número de COCs obtenidos durante la época reproductiva y anestro estacional ( $P>0.05$ ) (Figura 15).

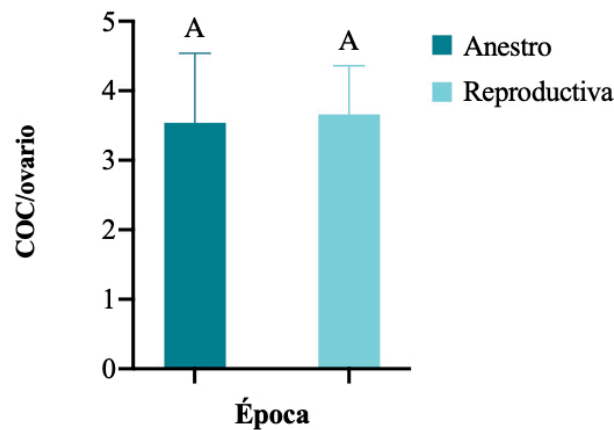


Figura 15. Ovocitos recuperados por ovario

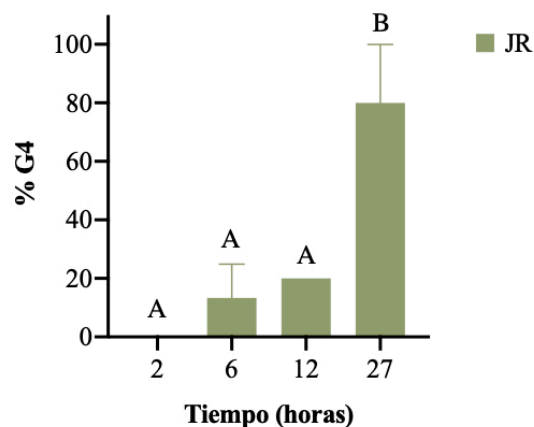
Comparación entre el promedio de ovocitos recuperados de ovarios colectados en anestro estacional y época reproductiva.

### Tasa de maduración durante el proceso de incubación

#### En época reproductiva

La tasa de COCs que alcanzaron el grado 4 de maduración durante el proceso de incubación en el medio adicionado con JR durante la época reproductiva mostró diferencias estadísticamente significativas a las 27 horas, en comparación con las 2, 6 y 12 horas de

incubación ( $P < 0.05$ ) (Figura 16), observándose un efecto positivo en el grado de maduración al final del proceso de maduración al suplementar con JR durante la época reproductiva.

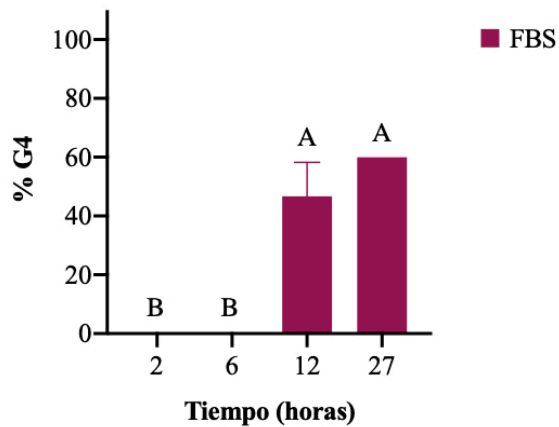


**Figura 16. Porcentaje de ovocitos madurados con JR a las 2, 6, 12 y 27 horas en época reproductiva.**

Porcentaje de COCs obtenidos durante época reproductiva con grado 4 de maduración con un 0.03% a las 2 horas, 13.4% (+/- 11) a las 6, 20% a las 12 horas y de 80% (+/- 20) a las 27 horas de incubación en medio adicionado con JR.

La tasa de COCs que alcanzaron el grado 4 de maduración durante el proceso de incubación en el medio adicionado con FBS durante la época reproductiva, mostró diferencias estadísticamente significativas a las 12 y 27 horas con respecto a las 2 y 6 horas de incubación, donde se obtuvo un 0% de maduración ( $P < 0.05$ ) (Figura 17) y un efecto positivo en el grado de maduración a partir de las 12 horas del proceso de maduración al utilizar un medio convencional adicionado con FBS.



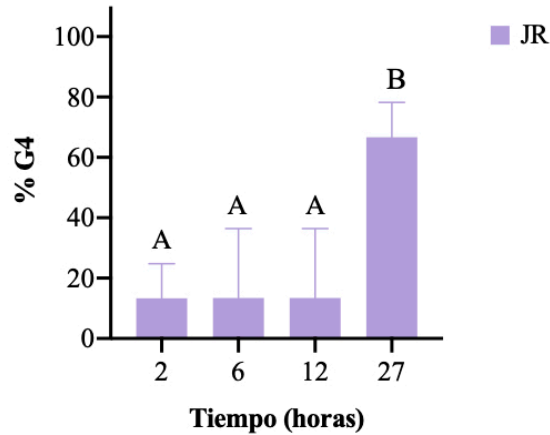


**Figura 17. Porcentaje de ovocitos madurados con JR a las 2, 6, 12 y 27 horas en época reproductiva.**

Porcentaje de COCs obtenidos durante época reproductiva con grado 4 de maduración con 0% de maduración a las 2 y 6 horas, 46.6%(+/- 11.5) a las 12 horas y 60% a las 27 horas de incubación en medio adicionado con FBS.

### **En anestro estacional**

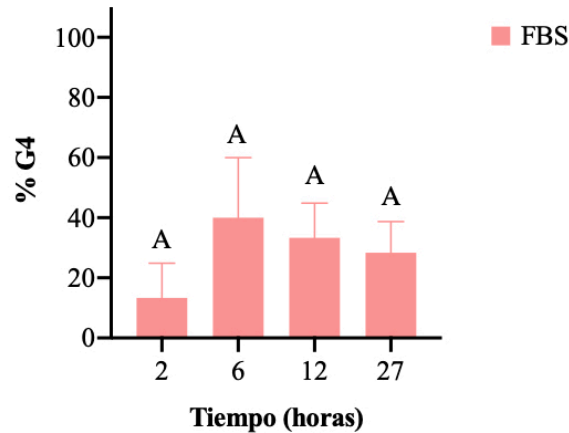
La tasa de COCs que alcanzaron el grado 4 de maduración en el medio adicionado con JR durante la época de anestro, mostro diferencias estadísticamente significativas a las 27 horas de incubación en comparación con los tiempos 2, 6 y 12 h de incubación ( $P < 0.05$ ) (Figura 18).



**Figura 18. Porcentaje de ovocitos ovinos madurados con JR en época de anestro.**

Porcentaje de COCs obtenidos durante época de anestro con grado 4 de maduración. Se obtuvo 13.4% (+/- 11) a las 2 horas, 13.4% (+/- 23) a las 6 y 12 horas y 66.6% (+/- 11.54) a las 27 horas de incubación en medio adicionado con JR.

La tasa de COCs que alcanzaron el grado 4 de maduración en el medio adicionado con FBS durante la época de anestro estacional no mostraron diferencias estadísticamente significativas durante el proceso de incubación evaluado a las 2, 6, 12 y 27 horas ( $P > 0.05$ ) (Figura 19).



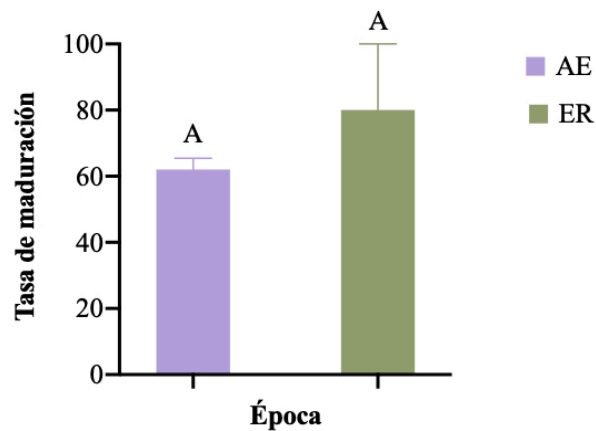
**Figura 16. Porcentaje de ovocitos de ovino madurados con FBS en época de anestro.**

Porcentaje de COCs obtenidos durante época de anestro con grado 4 de maduración. Se obtuvo una tasa de 13.4% (+/- 11) a las 2 horas, 40% (+/- 20) a las 6 horas, 33.3% (+/- 11) a las 12 horas y 28.3% (+/- 10) a las 27 horas de incubación en medio adicionado con FBS.

Con base en los resultados anteriores (Figura 18 y 19), se puede suponer que la suplementación del JR en vez de FBS en el medio de maduración funciona mejor para alcanzar el grado 4 de maduración a las 27 horas, cuando los ovocitos madurados fueron colectados en época de anestro.

### **Tasa de maduración de ovocitos con JR**

Se comparó la tasa de maduración de los COCs madurados con medio adicionado con JR colectados durante anestro estacional y durante la época reproductiva (Figura 20). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas épocas con este tratamiento ( $P > 0.05$ ). Por lo tanto, el tratamiento con JR tiene el mismo efecto en los ovocitos independientemente de la época en la que fueron recuperados.

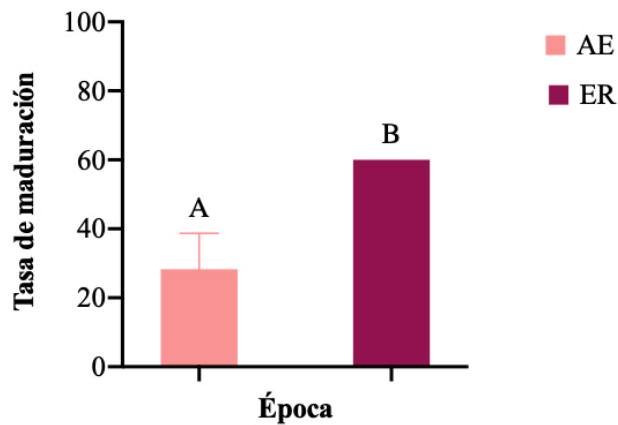


**Figura 17. Tasa de maduración de ovocitos madurados con JR en anestro estacional y época reproductiva**

Comparación de la tasa de maduración de ovocitos incubados en medio adicionado con JR, colectados durante anestro estacional (AE) con un resultado de 62% (+/- 3.4) y durante época reproductiva (ER) con un 80% (+/- 20) de maduración.

### **Tasa de maduración de ovocitos con FBS**

Al comparar la tasa de maduración de los COCs colectados durante el anestro estacional y la época reproductiva y que fueron madurados en medio adicionado con FBS, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas épocas ( $P < 0.05$ ) sugiriendo que el tratamiento con FBS se comporta de manera diferente entre los ovocitos colectados durante la época reproductiva y de anestro estacional (Figura 21).

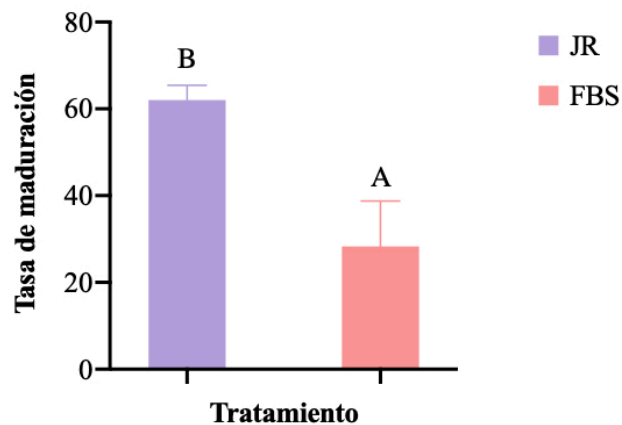


**Figura 18. Tasa de maduración de ovocitos madurados con FBS en anestro estacional y época reproductiva**

Comparación de la tasa de maduración de ovocitos incubados en medio adicionado con FBS, colectados durante anestro estacional (AE) con una tasa de maduración de 28.3% (+/- 10) y en la época reproductiva (ER) con una tasa de maduración del 60%.

### **Tasa de maduración de ovocitos en anestro estacional**

Se compararon las tasas de maduración de los COCs incubados en medio adicionado con JR contra medio adicionado con FBS durante la época de anestro estacional (Figura 22), se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ), mostrando una mejor tasa de maduración en aquellos ovocitos madurados con la adición de JR.

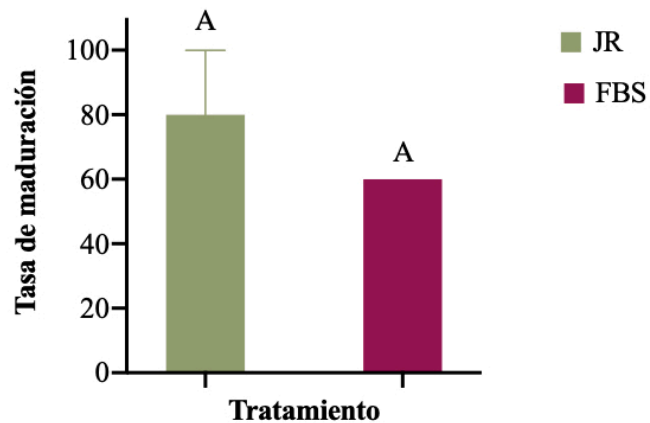


**Figura 19. Tasas de maduración obtenidas en ovocitos colectados en anestro estacional madurados con JR y FBS.**

Comparación en la tasa de maduración de ovocitos recuperados durante la época de anestro estacional e incubados en medio adicionado con FBS obteniendo 28.3% (+/- 10) y con JR con una tasa del 66% (+/- 11.5).

### **Tasa de maduración de ovocitos en época reproductiva**

Al comparar las tasas de maduración de los COCs incubados en medio adicionado con JR contra medio adicionado con FBS durante la época reproductiva (Figura 23), no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ), probando que el medio de maduración adicionado con JR funciona igual que el medio adicionado con FBS durante la época reproductiva.



**Figura 20. Tasas de maduración obtenidas en ovocitos colectados en época reproductiva madurados con JR y FBS.**

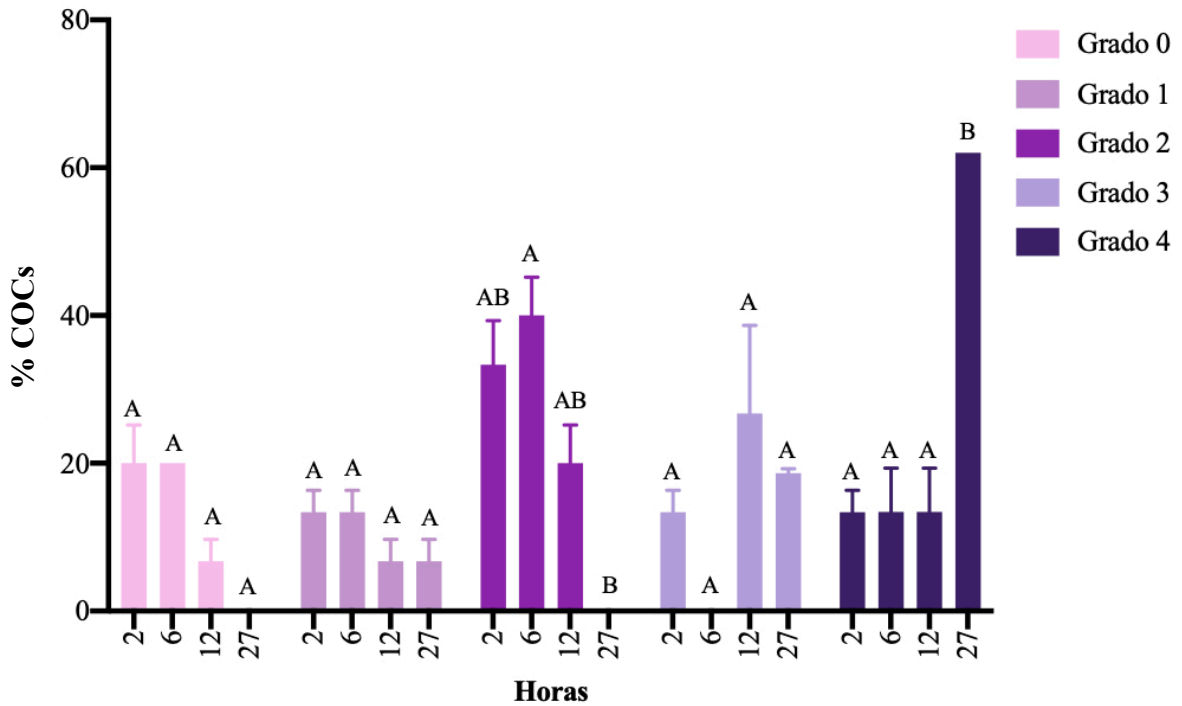
Comparación en la tasa de maduración de ovocitos recuperados durante la época reproductiva e incubados en medio adicionado con FBS alcanzando una tasa de maduración del 60% y del 80% (+/- 20) con JR.

### **Tasas de maduración durante la transición en el proceso de incubación**

Se evaluó la transición en los grados de maduración de los COCs a las 2, 6, 12 y 27 horas de incubación durante el anestro estacional y la época reproductiva en medio adicionado con JR y FBS.

#### **Transición en el proceso de IVM con JR durante el de anestro estacional**

Al comparar la transición en la maduración de COCs obtenidos en anestro estacional y madurados con JR, se observó que el porcentaje de COCs en grado 0, 1 y 3 no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de incubación ( $P > 0.05$ ), sin embargo, el grado 2 a las 27 h de incubación, mostró diferencia contra las 6 h de incubación ( $P < 0.05$ ), demostrando que la mayoría de los COCs se encuentran en grado 2 a las 6 horas, indicando su transición en el proceso de maduración. Por otra parte los tiempos 2, 6 y 12 h mostraron diferencia estadística contra el tiempo 27 h de incubación para el grado 4 ( $P < 0.05$ ), lo cual sugiere que la mayoría de los COCs colectados durante el anestro estacional alcanzan la maduración a las 27 horas en un medio adicionado con JR (Figura 24).



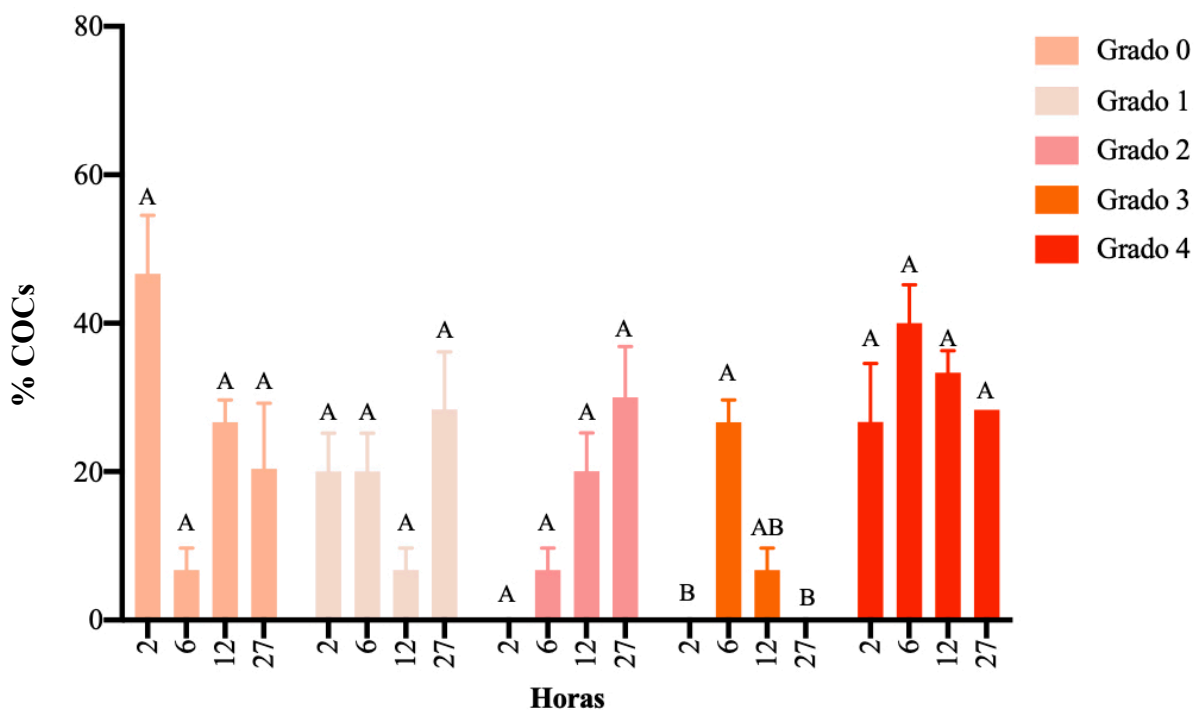
**Figura 21. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con JR en época de anestro.**

Transición en el proceso maduración de ovocitos recuperados en la época de anestro en medio adicionado con JR. En el eje Y se muestra el % de COCs en cada grado de maduración, en el eje X se distribuyen los grados de maduración 0 – 4, cada uno con los tiempos (en horas) 2, 6, 12 y 27 en las que fueron evaluados para su clasificación. Para el grado 0 se obtuvo una media del 20% a las 2 y 6 horas, a las 12 horas una media de 6.7% y del 0% a las 27 horas. En cuanto al grado 1 se obtuvo una media del 13.3 (+/-11) para las 0 y 2 horas, mientras que a las 12 y 27 horas se obtuvo una media de 6.7%. En grado 2 se obtuvo una media de 33.3% (+/- 20) a las 2 horas, del 40% (+/-20) a las 6 horas, del 20% a las 12 horas y del 0% a las 27 horas. En el grado 3 logró una tasa del 13% a las 2 horas, del 0% a las 6 horas, del 26.7% a las 12 y del 18.6%(+/-2.3) a las 27 horas. Para el grado 4 se alcanzó una media del 13.6% a las 2, 6 y 12 horas, mientras que a las 27 horas se obtuvo una media del 62% (+/- 3.4).



### Transición en el proceso de IVM con FBS durante el de anestro estacional

Al evaluar el porcentaje de COCs obtenidos en anestro estacional, madurados con FBS en el grado 0, 1, 2 y 4, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de incubación ( $P>0.05$ ), por otra parte el porcentaje de COCs en grado 3 fue significativamente diferente a las 2 y 27 horas en comparación con el tiempo 6 ( $P<0.05$ ). Estos resultados podrían indicar que la maduración de los COCs colectados durante el anestro estacional incubados en un medio con FBS es variable en cada replica y por lo tanto, no se puede estimar el porcentaje de COCs que alcanzaran la maduración celular (Figura 25).



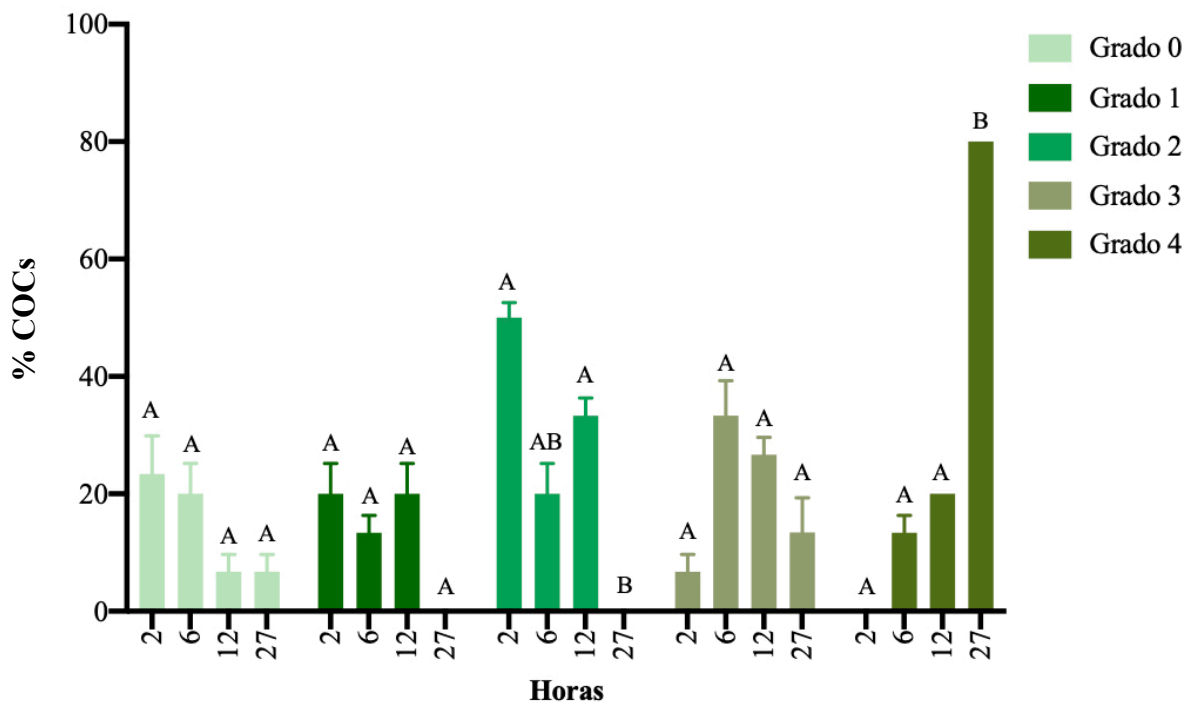
**Figura 22. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con FBS en época de anestro.**

Transición en el proceso maduración de ovocitos recuperados en la época de anestro en medio adicionado con FBS. En el eje Y se muestra el % de COCs en cada grado de maduración, en el eje X se distribuyen los grados de maduración 0 – 4, cada uno con los tiempos (en horas) 2, 6, 12 y 27 en las que fueron evaluados para su clasificación. Para el grado 0 se obtuvo una media del 46.6%(+/-30) a las 2, del 6.73% a las 6 horas, a las 12 horas una media del 26.6% (+/- 11.5) y del 20% a las 27 horas. En cuanto al grado 1 se obtuvo una media del 20.03 (+/-19)

para las 2 y 6 horas, mientras que a las 12 horas se obtuvo un 6.7% y a las 27 horas se alcanzó una media de 28.4%. En grado 2 se obtuvo una media de 0% a las 2 horas, del 6.7% a las 6 horas, del 20% a las 12 horas y del 30% (+/-26) a las 27 horas. En el grado 3 se obtuvo una tasa del 0% a las 2 y 27 horas, a las 6 horas una tasa del 26.6% (+/-11) y del 6.7% a las 12 horas. Para el grado 4 la media a las 2 horas fue de 26.7%, de 40% (+/- 20) a las 6 horas, del 33.3% (+/- 11.5) a las 12 horas y del 28.3% (+/-10) a las 27 horas.

### **Transición en el proceso de IVM con JR durante época reproductiva**

El porcentaje de COCs obtenidos en anestro estacional y madurados con JR, no presentó diferencias estadísticamente significativas para los grados 0, 1 y 3 ( $P>0.05$ ), sin embargo, se halló una diferencia estadísticamente significativa a las 27 horas para el porcentaje de COCs en grado 4 de maduración ( $P<0.05$ ), mostrando que los COCs colectados durante la época reproductiva alcanzan la maduración a las 27 horas en un medio adicionado con JR (Figura 26).

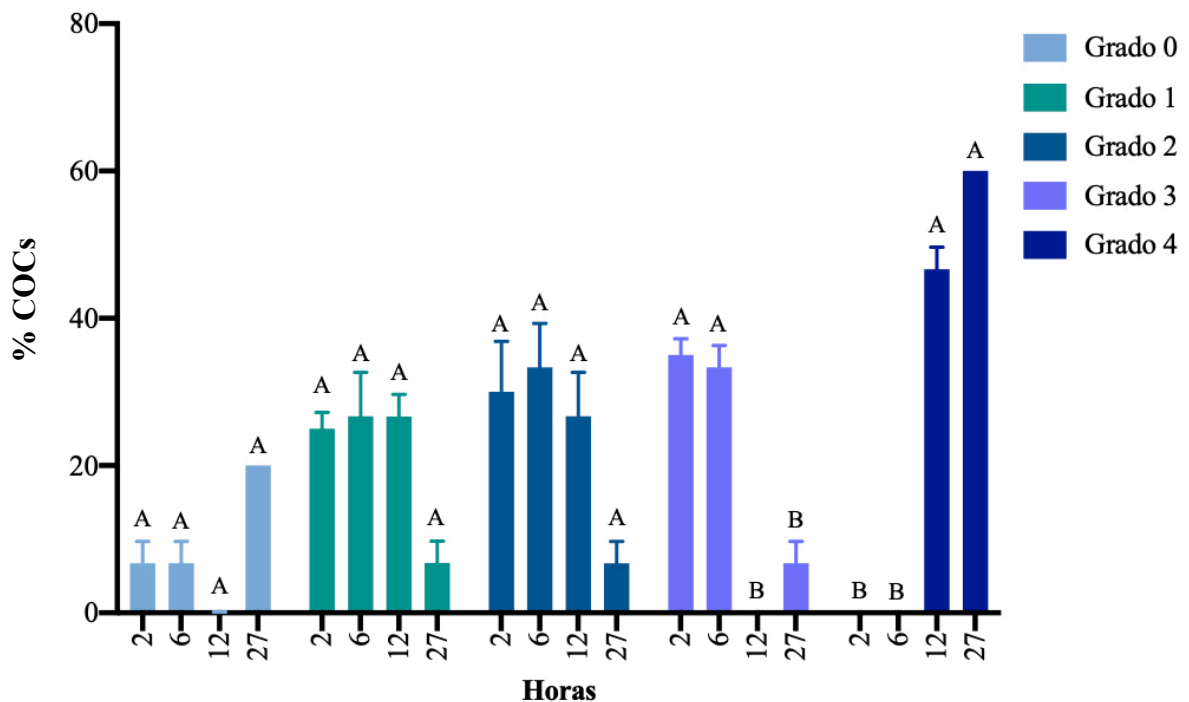


**Figura 23. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con JR en época reproductiva.**

Transición en el proceso maduración de ovocitos recuperados en época reproductiva en medio adicionado con JR. En el eje Y se muestra el % de COCs en cada grado de maduración, en el eje X se distribuyen los grados de maduración 0 – 4, cada uno con los tiempos (en horas) 2, 6, 12 y 27 en las que fueron evaluados para su clasificación. Para el grado 0 se obtuvo una media del 23.4% a las 2 horas, del 20.03% a las 6 horas y de 6.7% (+/-11) a las 12 y 27 horas. En cuanto al grado 1 se obtuvo una media del 20.03 (+/-19) para las 2 y 12 horas, mientras que a las 6 horas se alcanzó una tasa del 13.3% y del 0% a las 27 horas. En grado 2 se obtuvo una media de 50% (+/-10) a las 2 horas, del 20% (+/-19) a las 6 horas, del 33% (+/- 11.5) a las 12 horas y del 0% a las 27 horas. En el grado 3 logró una tasa del 6.7% a las 2 horas, del 33.3% (+/- 23) a las 6 horas, del 26.7% (+/- 11.5) a las 12 y del 13.4% a las 27 horas. Para el grado 4 se alcanzó una media del 0% a las 2 horas, del 13.4% (+/- 11) a las 6 horas, del 20% a las 12 horas, mientras que a las 27 horas se obtuvo una media del 80% (+/- 20).

### Transición en el proceso de IVM con FBS durante época reproductiva

Durante la transición en el proceso de maduración de COCs colectados en época reproductiva y madurados en medio adicionado con FBS (Figura 27), no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de maduración para el porcentaje de COCs en grado 0, 1 y 2 ( $P>0.05$ ), por otra parte el porcentaje de COCs en grado 3 fue significativamente diferente a las 12 y 27 horas, en las cuales se observó un porcentaje mínimo de los COCs en dicha categoría. A su vez el porcentaje de COCs en grado 4 fue significativamente diferente en las 2 y 6 horas en comparación con las 12 y 27 horas, en las cuales se presentó la mayoría de los COCs de esta categoría. Estos resultados nos hacen suponer los COCs obtenidos en época reproductiva e incubados en medio adicionado con FBS alcanzan su maduración entre las 12 y 27 horas.



**Figura 24. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con FBS en época reproductiva.**

Transición en el proceso maduración de ovocitos recuperados en época reproductiva en medio adicionado con FBS. En el eje Y se muestra el % de COCs en cada grado de maduración, en el eje X se distribuyen los grados de maduración 0 – 4, cada uno con los tiempos (en horas) 2, 6, 12 y 27 en las que fueron evaluados

para su clasificación. Para el grado 0 se obtuvo una media del 6.7% (+/- 11.4) a las 2 y 6 horas, del 0.1% a las 12 horas y del 20% a las 27 horas. En cuanto al grado 1 se logró una media del 25% (+/-8.6) a las 2 horas, una media del 26.7% a las 6 horas (+/- 23) y las 12 horas (+/-11.5), mientras que a las 27 horas se alcanzó una tasa del 6.67%. En grado 2 se obtuvo una media de 30% (+/-25) a las 2 horas, del 33.3% (+/-23) a las 6 horas, del 26.7% (+/- 23) a las 12 horas y del 6.7% a las 27 horas. En el grado 3 logró una tasa del 35% (+/- 8.6) a las 2 horas, del 33.3% (+/- 11.5) a las 6 horas, del 0% a las 12 y del 6.7% a las 27 horas. Para el grado 4 se alcanzó una media del 0% a las 2 y 6 horas, del 46.6% (+/- 11) a las 12 horas y del 60% a las 27 horas.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra que la jalea real es capaz de reemplazar al FBS para la IVM de ovocitos de ovino, basándonos en los antecedentes sobre el efecto positivo del uso de JR en la maduración de ovocitos como es lo descrito por Mishima *et al.* (2003) y Elnagar S. (2010), quienes demostraron que la JR mejora la tasa de maduración de ovocitos al adicionarse a los medios convencionales con FBS debido a que es fuente exógena de estrógenos (18,22), también Abd-Allah (2012) reportó la capacidad de la JR para activar las enzimas encargadas de la síntesis de ácido hialurónico para la expansión de las células del cumulus, signo característico de la maduración (24).

El primer hallazgo durante esta investigación fue encontrar la misma tasa de recuperación de COCs entre los ovarios colectados en época reproductiva y los colectados en anestro estacional (Figura 15), obteniendo un promedio de 3.5 (+/- 0.8) COCs por ovario, estos resultados obtenidos son comparables con los mencionados en otro estudio publicado por Pawshe *et al.* (1996), en el cual se compararon diferentes métodos de obtención de ovocitos, obteniendo un promedio de 3 (+/- 1) COCs por ovario (148), los hallazgos del presente trabajo y los reportados por Pawshe se contraponen con lo descrito por Davachi *et al.* (2017), quien afirmó que durante la época reproductiva, la tasa de recuperación de COCs es mayor debido al nivel óptimo de gonadotropinas y esteroides presentes (153) obteniendo un promedio de 5.8 (+/1) de COCs por ovario durante la época reproductiva y una media de 3.4 (+/-1.1) durante el anestro estacional; por el contrario, el estudio realizado por Widyastuti *et al.* (2017), indicó mayor tasa de recuperación de COCs de ovarios colectados durante anestro estacional, obteniendo un promedio de 10 (+/-2.5) COCs por ovario en anestro estacional, en comparación con 6.48 (+/- 0.3) en época reproductiva, atribuyendo dicho resultado a la presencia de CL ya que puede contribuir a una condición desfavorable para el crecimiento folicular, dando como resultado, su regresión (12,120,154).

Asimismo, durante esta investigación se compararon las tasas de maduración obtenidas en ovocitos colectados en época reproductiva contra anestro estacional demostrando que la tasa

de maduración utilizando FBS durante la época de anestro estacional fue menor en comparación con la época reproductiva (Figura 21), sin embargo, al adicionar JR se consiguieron tasas de maduración similares en ambas épocas (anestro estacional y época reproductiva) (Figura 20), estos resultados se contraponen con los obtenidos por Davachi *et al.* en 2017, que indican que la tasa de éxito en la IVM de ovocitos de pequeños rumiantes no presenta diferencias significativas entre ambas épocas al utilizar un medio de maduración convencional adicionado con FBS (153).

Otro resultado sobresaliente del presente estudio fue la diferencia entre la tasa de maduración obtenida con ambos tratamientos (JR vs FBS) durante la época de anestro (Figura 17 y 19), se demostró que al madurar los COCs con medio adicionado con JR en vez de FBS, un mayor porcentaje de COCs alcanza el grado 4 de maduración. En contraste, la tasa de maduración obtenida en época reproductiva no es significativamente diferente entre los tratamientos (Figura 23). Anteriormente Zhu *et al.* (2018), reportó que no existe diferencia entre la tasa de maduración de ovocitos utilizando el mismo medio adicionado con FBS entre época reproductiva y anestro (11), sin embargo, los hallazgos del presente estudio, sugieren que el FBS se comporta de manera diferente entre épocas y que la adición de JR mejora los resultados obtenidos durante la época de anestro en comparación con el uso de FBS.

Jochems y colaboradores (2002), reportaron que hay sustancias presentes en el FBS que aún no se han identificado y de las sustancias identificadas, se desconoce la función completa en las células cultivadas (130), lo cual sugiere escasa repetibilidad en los experimentos llevados a cabo con dicho suplemento. Asimismo, Gstraunthaler (2003 y 2013) ha reportado una constante variabilidad en la composición entre lotes de FBS, que se ha visto reflejada en la inconsistencia de los resultados obtenidos en sus diferentes estudios (16,17). Corroborando lo anterior, el presente estudio encontró diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de maduración de ovocitos madurados con FBS en ambas épocas (Figura 21). El hecho de que se desconozcan los efectos específicos del FBS sobre el proceso de maduración de los ovocitos, representa una limitante para suponer el origen de su mejor funcionamiento en la IVM de los COCs obtenidos durante la época reproductiva y enfatiza la necesidad de utilizar alternativas como es la JR en los medios de maduración.

Otro hallazgo relevante en este estudio, fue el comportamiento de los COCs durante la transición hacia la maduración. Tanto en época reproductiva como en anestro estacional (Figura 24 y 26), se encontró una diferencia significativa entre los COCs con una maduración grado 4 observados a las 27 horas en comparación con los otros tiempos de maduración, sugiriendo que la mayoría de los COCs colectados durante el anestro estacional alcanzan la maduración a las 27 horas en un medio adicionado con JR.

El hecho de que los COCs madurados en un medio adicionado con JR, hayan alcanzado la maduración a las 27 horas independientemente de la época en la que se realizó la IVM, puede atribuirse a las propiedades que posee la JR como fuente de energía para la producción de gonadotropinas como fue descrito por Husein y Haddad (2006), así como por su efecto antioxidante reportado por Tamura *et al.* (2009). Asimismo, en un estudio publicado por Dhali (2017), se observó que la expresión de los genes promotores de Has2 y Ptgs2 (enzimas involucradas en la expansión del cúmulus) es mayor antes de las 12 horas de maduración y vuelve a incrementarse justo antes de la ovulación (155), considerando que la expresión de dichos genes activa la expansión de las CC, se presume que el patron observado en la transición de la maduración sea consecuencia del efecto que tiene la JR sobre las activación de dichos factores, como lo reportó anteriormente Abd-Allah (2012), lo cual justifica que el porcentaje de ovocitos en grado dos es mayor a las 2 y 6 horas (Figura 24).

Adicionalmente, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la hora 6 de incubación de los COCs grado 3 madurados con FBS durante la época de anestro, sin embargo, no hubo diferencia entre los tiempos de maduración del grado 4 (Figura 25). En contraste, los resultados en la maduración con FBS de COCs obtenidos en época reproductiva son estadísticamente diferentes en los tiempos 12 y 27 h del grado 3, así como en los tiempos 2 y 6 del grado 4, sugiriendo que bajo estas condiciones los ovocitos alcanzan su maduración entre las 12 y 27 horas. Considerando lo descrito por Dhali (2017) y por Bhardwaj (2016), se sugiere un comportamiento diferente del FBS entre los COCs colectados en época reproductiva y en anestro estacional, lo cual puede relacionarse con el momento en que se activa la expresión de los genes Has2 y Ptgs2 (155,156).



Considerando los resultados obtenidos de este trabajo y los antecedentes publicados por Amiri (2015), es posible determinar la dosis funcional para la IVM de ovocitos de ovino y establecer a la JR como una opción confiable y segura para la maduración celular (150), logrando proponer un reemplazo para el FBS en los medios utilizados para la IVM.

## **CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos a través de los protocolos de IVM utilizados en el presente trabajo, se acepta la hipótesis de que la JR funciona como reemplazo del FBS en el medio de maduración de ovocitos de ovinos, independientemente de la época reproductiva en la que los COCs sean colectados.

Sumado a esto se encontró que la JR tiene una mejor tasa de éxito sobre el FBS en la IVM realizada durante el anestro estacional, además, los efectos de la JR sobre la tasa de maduración de ovocitos a grado 4 es replicable en ambas épocas, en contraste con el medio adicionado con FBS.

Asimismo, se encontraron tasas de recuperación de COCs similares entre ambas épocas, sin embargo, no se han presentado resultados semejantes en trabajos anteriores.

## ANEXOS

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía reproductiva de la oveja. Modificado de O'Neal, (2015).....	5
Figura 2: Anatomía ovárica .....	6
Figura 3. El folículo .....	7
Figura 4. Esteroidogénesis.....	8
Figura 5. Foliculogénesis y ovogénesis .....	11
Figura 6. Factores para la activación de la meiosis .....	13
Figura 7. Eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal .....	16
Figura 8. Oleadas foliculares y niveles hormonales durante el ciclo estral de la oveja.....	17
Figura 9. Ciclo anual reproductivo en ovinos.....	20
Figura 10. Síntesis de melatonina .....	21
Figura 11. Comparación en la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación de estradiol. .....	22
Figura 12. Localización de las fases experimentales.....	32
Figura 13. Clasificación de COCs de ovino de acuerdo a la clasificación de Wani (1999). 34	
Figura 14. Grados de maduración de COCs de ovinos, de acuerdo a Pawshe (1996).....	36
Figura 15. Ovocitos recuperados por ovario.....	41
Figura 19. Porcentaje de ovocitos de ovino madurados con FBS en época de anestro. ....	45
Figura 20. Tasa de maduración de ovocitos madurados con JR en anestro estacional y época reproductiva .....	46
Figura 21. Tasa de maduración de ovocitos madurados con FBS en anestro estacional y época reproductiva .....	47
Figura 22. Tasas de maduración obtenidas en ovocitos colectados en anestro estacional madurados con JR y FBS.....	48
Figura 23. Tasas de maduración obtenidas en ovocitos colectados en época reproductiva madurados con JR y FBS.....	49
Figura 24. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con JR en época de anestro. ....	50

Figura 25. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con FBS en época de anestro.....	51
Figura 26. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con JR en época reproductiva.....	53
Figura 27. Transición a las 2, 6, 12 y 27 horas en el proceso de maduración de ovocitos madurados con FBS en época reproductiva.....	54

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Duración de las etapas del ciclo estral en ovinos. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Cuadro 2. Composición del suero fetal bovino.....	25
Cuadro 3. Composición química de la jalea real .....	27

## ABREVIATURAS

<b>AMH</b>	Hormona anti-Mülleriana
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica ósea
<b>cAMP</b>	Adenosin monofosfato cíclica
<b>CC</b>	Células del cumulus
<b>CEEFs</b>	Factores facilitadores de la expansión del cúmulo
<b>cGMP</b>	Guanosin monofosfato cíclico
<b>CH</b>	Cuerpo hemorrágico
<b>CL</b>	Cuerpo lúteo
<b>CNP</b>	Péptido natriurético C
<b>COC</b>	Complejo cumulus ovocito
<b>Cx</b>	Conexina
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EGF-like</b>	Similar al factor de crecimiento epidermal
<b>ERK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino

<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>GDF-9</b>	Factor de crecimiento / diferenciación 9
<b>GnIH</b>	Hormona inhibidora de gonadotropinas
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>GREM1</b>	Gremlin
<b>GTP</b>	Guanosin trifosfato
<b>GVBD</b>	Ruptura de la vesícula germinal
<b>Has2</b>	Gen codificador para hialuronano sintasa 2
<b>IA</b>	Inseminación artificial
<b>IVC</b>	Cultivo de embriones <i>in vitro</i>
<b>IVD</b>	Producción de embriones <i>in vivo</i>
<b>IVEP</b>	Producción de embriones <i>in vitro</i>
<b>IVF</b>	Fertilización <i>in vitro</i>
<b>IVM</b>	Maduración <i>in vitro</i>
<b>JR</b>	Jalea real
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MII</b>	Metafase II
<b>MPF</b>	Factor promotor de la maduración
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>NPR2</b>	Receptor del péptido natriurético
<b>P4</b>	Progesterona
<b>P450</b>	Enzima citocromo P450
<b>PDE3</b>	Fosfodiesterasa
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F2 $\alpha$
<b>Ptgs2</b>	Gen codificador para prostaglandina-endoperoxidosintasa 2
<b>SMAD</b>	Proteína SMAD, segundo mensajero.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>VG</b>	Vesícula germinal
<b>ZP</b>	Zona pelúcida

## REFERENCIAS

1. Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4(1):255–68.
2. Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK. In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. *Clin Exp Reprod Med.* 2014;41(2):41–6.
3. Paramio MT, Izquierdo D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(s4):37–48.
4. Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, et al. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21(3):451–61.
5. Downs SM. Nutrient pathways regulating the nuclear maturation of mammalian oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2015;27(4):572–82.
6. Arroyo J. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Trop Subtrop agroecosystems.* 2011;14(9):829–45.
7. Hafez ESE. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *J Agric Sci [Internet].* 1952 Jul 27 [cited 2020 Nov 19];42(3):189–231. Available from:  
[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0021859600056896/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0021859600056896/type/journal_article)
8. Karsch J, Barrell K, Moenter S, Caraty A (Univertisy of M. Seasonal changes of Gonadotropin-Releasing Hormoe secretion in the Ewe. *Biol Reprod.* 1992;46:1130–5.
9. Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull.* 1997;44(4):431–8.

10. Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. Vol. 40, Recent progress in hormone research. 1984. 185–232 p.
11. Zhu J, Moawad AR, Wang CY, Li HF, Ren JY, Dai YF. Advances in in vitro production of sheep embryos. *Int J Vet Sci Med.* 2018;6(February):S15–26.
12. Mara L, Sanna D, Casu S, Dattena M, Muñoz IMM. Blastocyst rate of in vitro embryo production in sheep is affected by season. *Zygote.* 2014;22(3):366–71.
13. Shi JM, Yi JY, Tian XZ, Wang F, Lian ZX, Han H Bin, et al. Effects of seasonal changes on the ovulation rate and embryo quality in superovulated Black Suffolk ewes. *Neuroendocrinol Lett.* 2015;
14. Van Der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol Vitro.* 2004;18(1):1–12.
15. Mahmoud KGM. Cytogenetics of in vitro matured oocytes - A review. *Glob Vet.* 2014;12(3):384–92.
16. Gstraunthaler G, Lindl T, Van Der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology.* 2013;65(5):791–3.
17. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX Altern zu Tierexperimenten.* 2003;20(4):275–81.
18. Amiri MV, Deldar H, Pirsaraei ZA. Impact of supplementary royal jelly on in vitro maturation of sheep oocytes: Genes involved in apoptosis and embryonic development. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(1):31–8.
19. Elnagar SA. Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility." *Anim Reprod Sci.* 2010;121(1–2):174–80.
20. Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Alagawany M, Taha AE, Elnesr SS, Abd Elmonem

- OM, et al. Useful impacts of royal jelly on reproductive sides, fertility rate and sperm traits of animals. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020;(December 2019):1–11.
21. Kridli RT, Husein MQ, Humphrey WD. Effect of royal jelly and GnRH on the estrus synchronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges. *Small Rumin Res*. 2003;49(1):25–30.
  22. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, et al. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1–3):215–20.
  23. Mazangi HR, Deldar H, Kashan NE, Mohammadi-Sangcheshmeh A. 305 Royal Jelly Treatment During Oocyte Maturation Improves in Vitro Meiotic Competence of Goat Oocytes By Influencing Intracellular Glutathione Synthesis and Apoptosis Gene Expression. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(1):241.
  24. Abd-Allah. Effect of Royal Jelly on the Fertilizing Ability of Buffalo Spermatozoa In Vitro. *J Buffalo Sci*. 2012;1(1):1–4.
  25. Edmondson MA, Roberts JF, Baird AN, Bychawski S, Pugh DG. Theriogenology of Sheep and Goats [Internet]. Second Edi. *Sheep and Goat Medicine*. Elsevier; 2012. 150–230 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-2353-3.10008-3>
  26. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 2005;64(5):1225–35.
  27. Dun RB. THE CERVIX OF THE EWE –ITS IMPORTANCE IN ARTIFICIAL INSEMINATION OF SHEEP. *Aust Vet J* [Internet]. 1955 Apr;31(4):101–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1955.tb05513.x>
  28. Fukui Y, Roberts EM. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology* [Internet]. 1978 Nov;10(5):381–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0093691X78900420>
  29. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular



- renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;
30. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002;
  31. Conti M, Chang RJ. Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis [Internet]. Seventh Ed. Vols. 2–2, *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier Inc.; 2015. 2179-2191.e3 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00125-6>
  32. Schultz TW, Geneser F. *Textbook of Histology*. Trans Am Microsc Soc. 1987;
  33. Hutchinson JSM, Robertson HA. The Growth of the Follicle and Corpus Luteum in the Ovary of the Sheep. *Res Vet Sci* [Internet]. 1966 Jan;7(1):17–24. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34705-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34705-2)
  34. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. In: *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002.
  35. Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, Matuchansky C, et al. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2004;
  36. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*. 2009.
  37. Baumgarten SC, Stocco C. Granulosa cells. In: *Encyclopedia of Reproduction*. 2018.
  38. Walters EM. *Comparative Reproductive Physiology of Domestic Animals*. *Comp Reprod Biol*. 2008;117–31.
  39. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr Rev*. 1985;6(3):371–99.
  40. Young JM, McNeilly AS. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle.

Reproduction. 2010.

41. Hillier SG, Van Den Boogaard AMJ, Reichert LE, Van Hall E V. Intraovarian sex steroid hormone interactions and the regulation of follicular maturation: Aromatization of androgens by human granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;
42. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;
43. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2006.
44. Cárdenas H, Herrick JR, Pope WF. Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone. *Reproduction.* 2002;
45. Hickey TE, Marrocco DL, Gilchrist RB, Norman RJ, Armstrong DT. Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biol Reprod.* 2004;
46. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;
47. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science.* 2002.
48. Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod.* 1992;
49. Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol.* 1990;140(2):307–17.
50. Orisaka M, Mizutani T, Tajima K, Orisaka S, Shukunami KI, Miyamoto K, et al. Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-

- independent follicular growth in cattle. *Mol Reprod Dev.* 2006;
51. Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The Bone Morphogenetic Protein System in Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews.* 2004.
  52. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, Van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.* 1999;
  53. Lawson KA, Hage WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Foundation symposium.* 1994.
  54. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol.* 2000;
  55. Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol.* 2001;
  56. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2012;1822(12):1896–912. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
  57. Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 1990;
  58. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics.* 2008.
  59. Angeles Julaton VT, Reijo Pera RA. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet.* 2011;
  60. McNatty KP, Sawers RS. Relationship between the endocrine environment within the Graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cells in vitro. *J Endocrinol.* 1975;

61. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet.* 2008;
62. Jagarlamudi K, Rajkovic A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2012.
63. Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 2004;
64. Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, et al. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development.* 2009;
65. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 1997;
66. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. In: *Theriogenology.* 1997.
67. Kol S, Adashi EY. Intraovarian factors regulating ovarian function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 1995.
68. Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod.* 2002;
69. Erickson GF. The Graafian Follicle: A Functional Definition. In: *Ovulation.* 2000.
70. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 2003;
71. Millier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;
72. Findlay JK, Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Wreford NG, Robertson DM, et al.

- The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;
73. Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 1999.
  74. Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LE. Adenosine 3', 5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: Effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 1979;104(3):765–73.
  75. Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular development: Mouse, sheep, and human models. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction.* 2006.
  76. Hyttel P, Callesen H, Greve T. A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anat Embryol (Berl).* 1989;
  77. Kwintkiewicz J, Giudice LC. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2009.
  78. Sun QY, Miao YL, Schatten H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle.* 2009.
  79. Gordon I, editor. Laboratory production of cattle embryos [Internet]. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford: CABI; 2003. Available from: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20033162568>
  80. Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007;85(13 Suppl).
  81. Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology.* 2006;

82. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 2009;
83. Tripathi A, Prem Kumar K V., Chaube SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 2010.
84. Fülöp C, Szántó S, Mukhopadhyay D, Bárdos T, Kamath R V., Rugg MS, et al. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*. 2003;
85. Ochsner SA, Day AJ, Rugg MS, Breyer RM, Gomer RH, Richards JS. Disrupted function of tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology*. 2003;
86. Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A. Epidermal growth factor family members: Endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 2005;
87. Zhu J, Moawad AR, Wang C, Li H, Ren J, Dai Y. International Journal of Veterinary Science and Medicine Advances in in vitro production of sheep embryos. *Int J Vet Sci Med* [Internet]. 2018;6(December 2017):S15–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003>
88. Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci*. 2007;
89. Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, et al. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*. 2007;
90. Gittens JEI, Kidder GM. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci*. 2005;
91. Gittens JEI, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine

- signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci.* 2005;
92. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.* 1999;
  93. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology.* 2005;
  94. Norris DO, Carr JA. *The Endocrinology of Mammalian Reproduction. Vertebrate Endocrinology.* 2013. 317–374 p.
  95. Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res.* 2003;48(3):155–71.
  96. Rawlings NC, Bartlewski PM. *Clinical Reproductive Physiology of Ewes. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology: Second Edition.* 2006.
  97. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev.* 1993;
  98. Dizerega GS, Hodgen GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev.* 1981;
  99. Driancourt MA, Jego Y, Cahill LP, Bindon BM. Follicle population dynamics in sheep with different ovulation rate potentials. *Livest Prod Sci.* 1985;
  100. Crowe MA. *Reproduction, Events and Management: Estrous Cycles: Characteristics* [Internet]. Reference Module in Food Science. Elsevier; 2016. 1–5 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01039-8>
  101. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod*

- Fertil. 1999;115(1):111–24.
102. Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL. Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;124(3–4):259–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>
  103. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. 2000.
  104. Knickerbocker JJ, Wiltbank MC, Niswender GD. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domest Anim Endocrinol*. 1988;
  105. Mann GE, Payne JH, Lamming GE. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domest Anim Endocrinol*. 2001;
  106. Flint APF, Sheldrick EL. Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1986.
  107. Bittman EL, Karsch FJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod*. 1984;30(3):585–93.
  108. Malpaux B, Vigué C, Skinner DC, Thiéry JC, Pelletier J, Chemineau P. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci*. 1996;42(1–4):109–17.
  109. Malpaux B, Thiéry JC, Chemineau P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. In: *Reproduction Nutrition Development*. 1999.
  110. Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguié C, Karsch FJ. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biol Reprod*. 2000;63(3):769–74.



111. Correa M, Fernández L. Influence of Melatonin on the physiology and the conduct of ungulates. *Rev Investig Altoandin* [Internet]. 2017;19(3):337–50. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2313-29572017000300011](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572017000300011)
112. Revel FG, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology*. 2009.
113. Clarke IJ, Smith JT, Caraty A, Goodman RL, Lehman MN. Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*. 2009.
114. Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, et al. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Endocrinology*. 2012;153(12):5918–27.
115. Malpoux BC. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. 2006.
116. Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolen LM, Lehman MN. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology*. 2010.
117. López-Saucedo J, Santiago-Moreno J, Fierro R, Izquierdo D, Coloma MA, Catalá MG, et al. Fertilization capacity of cryopreserved Iberian ibex epididymal sperm in a heterologous in vitro fertilization assay. *Zygote*. 2014;
118. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod*. 1996;
119. Rodríguez-Dorta N, Cognié Y, González F, Poulin N, Guignot F, Touzé JL, et al. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*. 2007;
120. De Souza-Fabjan JMG, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, de Figueiredo JR, de

- Figueirêdo Freitas VJ, et al. In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*. 2014.
121. Paramio MT, Izquierdo D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(1):152–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.027>
  122. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. In: *Theriogenology*. 2003.
  123. Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Lone FA, Malik AA, Bhat FA. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Rumin Res*. 2012;
  124. Wani NA. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*. 2002.
  125. Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekytö M, Peippo J. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(1):42–9.
  126. Jayme DW, Epstein DA, Conrad DR. Fetal bovine serum alternatives. *Nature*. 1988.
  127. Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJG, et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004;
  128. Bilgen B, Orsini E, Aaron RK, Ciombor DMK. FBS suppresses TGF- $\beta$ 1-induced chondrogenesis in synoviocyte pellet cultures while dexamethasone and dynamic stimuli are beneficial. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;
  129. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem*

- Cells. 2005;
130. Jochems CEA, Van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *ATLA Altern to Lab Anim.* 2002;
  131. Lee J., Kang M., Choi J., Chun Y., Jang J. KS and PS. Comparative analysis of FBS containing media and serum free chemically defined media for adipose derived stem cells production. *Pediatr Crit Care Med.* 2002;3(4):397–9.
  132. Bulić-Jakuš F, Vlahović M, Jurić-Lekić G, Crnek-Kunstelj V, Šerman D. Gastrulating rat embryo in a serum-free culture model: Changes of development caused by teratogen 5-azacytidine. *ATLA Altern to Lab Anim.* 1999;
  133. Hawkes PW. Fetal bovine serum: Geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour Bioprocess.* 2015;2(1).
  134. Melliou E, Chinou I. Chemistry and bioactivities of royal jelly. In: *Studies in Natural Products Chemistry.* 2014.
  135. Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicioli A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research.* 2016.
  136. Boselli E, Caboni MF, Sabatini AG, Marcazzan GL, Lercker G. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie.* 2003;
  137. Kodai T, Umebayashi K, Nakatani T, Ishiyama K, Noda N. Compositions of royal jelly II. Organic acid glycosides and sterols of the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Chem Pharm Bull.* 2007;
  138. Khadr A, Abdou A, El-Sherbiny A. Age of puberty and fertility of male New Zealand white rabbits orally administered with royal jelly or / an bee honey. *J Anim Poult Prod* [Internet]. 2015 Apr 1;6(4):201–17. Available from: [https://jappmu.journals.ekb.eg/article\\_52748.html](https://jappmu.journals.ekb.eg/article_52748.html)
  139. Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, et al. Influence of royal jelly on the

- reproductive function of puberty male rats. *Food Chem Toxicol.* 2012;
140. Inoue SI, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: Correlation with reduced DNA damage. *Exp Gerontol.* 2003;38(9):965–9.
  141. 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.* 2006;
  142. Husein MQ, Kridli RT. Reproductive responses following royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesterone-treated Awassi ewes. *Anim Reprod Sci.* 2002;
  143. Tamura S, Kono T, Harada C, Yamaguchi K, Moriyama T. Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis mellifera*. *Food Chem.* 2009;
  144. Katska A. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle: Aspiration of follicular fluid with oocytes using a syringe and needle is a commonly used method of recovering immature bovine oocyte. 1984;7:461–3.
  145. Brem G. Laboratory production of cattle embryos. (1994). Vol. 52, *Livestock Production Science.* 1997. 273–274 p.
  146. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci.* 1979;48(1):76–86.
  147. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqi MA. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small Rumin Res.* 1999;34(1):71–6.
  148. Pawshe, C.H., Palanisamy, A., Taneja, M., Jain, S.K., Totey SM. Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. 1996;(96):23–53.

149. Khatun M, Bhuiyan MMU, Ahmed JU, Haque A, Rahman MB, Shamsuddin M. In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black Bengal goat oocytes. *J Vet Sci.* 2011;12(1):75–82.
150. Amiri MV, Deldar H, Pirsaraei ZA. Impact of supplementary royal jelly on in vitro maturation of sheep oocytes: Genes involved in apoptosis and embryonic development. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(1):31–8.
151. Karami Shabankareh H, Sarsaifi K, Mehrannia T. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: Effect of human menopausal serum. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(6):531–7.
152. Rouhollahi Varnosfaderani S, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini SM, Asadi Khashouei E, Abbasi H, et al. Importance of the GDF9 signaling pathway on cumulus cell expansion and oocyte competency in sheep. *Theriogenology.* 2013;80(5):470–8.
153. Davachi ND, Shahneh AZ, Kohram H, Zhandi M, Dashti S, Shamsi H, et al. In vitro ovine embryo production: The study of seasonal and oocyte recovery method effects. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;
154. Widyastuti R, Syamsunarno MRAA, Saili T, Boediono A. Oocyte Quality and Subsequent In Vitro Maturation of Sheep Oocyte-Cumulus Complex from Ovary with Presence and Absence of Corpus Luteum. *KnE Life Sci.* 2017;
155. Dhali A, Javvaji PK, Kolte AP, Francis JR, Roy SC, Sejian V. Temporal expression of cumulus cell marker genes during in vitro maturation and oocyte developmental competence. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(11):1493–500.
156. Bhardwaj R, Ansari MM, Pandey S, Parmar MS, Chandra V, Kumar GS, et al. GREM1, EGFR, and HAS2; the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production in vitro. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(8):2004–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.019>
156. 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) [Licenciatura]. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; 2019.