



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**EFFECTOS DE LA JALEA REAL EN LA VÍA  
DEPENDIENTE DE FSH DURANTE LA EXPANSIÓN  
DEL COMPLEJO CUMULUS- OVOCITO DE BOVINO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:**

**HÉCTOR MANUEL PÉREZ  
HERRERA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. HILDA MORAYMA GUERRERO  
NETRO**

**Ciudad Universitaria, CDMX., 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**DEDICATORIA**

*A mi Martha y Carlos,*

*Con mucho cariño para ustedes, pues me han ayudado incondicionalmente a  
cumplir mis metas y sueños.*

*Este logro también es de ustedes.*

*Infinitas gracias por todo lo que han hecho por mí, por su amor, esfuerzo y  
dedicación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora la Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro quien me dio la oportunidad de participar en sus proyectos y formar parte de su equipo. Le agradezco infinitamente por compartirme sus conocimientos, por su paciencia y su dedicación durante la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Christopher Alan Price por darme la oportunidad de colaborar con su equipo, permitirme trabajar en su laboratorio en el Centro de Investigación en Reproducción y Fertilidad (CRRF) y financiar mi estancia en Canadá.

A la Universidad Autónoma de Zacatecas por darme la oportunidad de realizar mis experimentos en sus instalaciones.

A Europa Meza Serrano y El-Arbi Abulghasem por su ayuda en el laboratorio, por sus consejos y observaciones que me han ayudado a mejorar día con día.

A mis compañeras y compañeros de la FMVZ-UNAM, Karla Vanessa Ruiz Gálvez, Ninel Castro Chávez, Angélica Daniela Reyes Perea, Santos Iván Pérez Muñiz y Ricardo Yavé Escamilla Casillas por brindarme su apoyo en la realización de este trabajo.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IA205220 por los recursos otorgados para que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo.

A Mitacs-Globalink por otorgarme la Beca MITACS de Investigación (No. IT22803/FR73997) como apoyo económico durante mi estancia en Canadá.

## INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN DE LITERATURA .....	10
1. Anatomía y fisiología del ovario .....	10
1.1 Anatomía.....	10
1.2 Control endócrino.....	11
1.3 Ciclo estral.....	13
2. Fisiología del Folículo Ovárico.....	16
2.1 Foliculogénesis .....	16
2.2 Microambiente Folicular .....	18
2.3 Maduración del ovocito.....	21
2.4 Expansión del cumulus.....	22
3.1 Medio de Maduración .....	24
4. Uso de Jalea Real en la IVM .....	28
4.1 Propiedades bioquímicas de la Jalea real.....	28
4.2 Jalea Real como reactivo durante la IVM .....	30
JUSTIFICACIÓN .....	32
HIPOTESIS .....	33
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Maduración <i>in vitro</i> .....	35
Evaluación de la expansión del cumulus .....	36
PCR en Tiempo Real.....	36
Western-Blot.....	37
RESULTADOS .....	40
DISCUSIÓN .....	44
CONCLUSIÓN.....	47
ANEXO .....	51
REFERENCIAS .....	52



## RESUMEN

PÉREZ HERRERA HÉCTOR MANUEL. Efectos de la Jalea Real en la vía dependiente de FSH durante la expansión del complejo cumulus-ovocito de bovino. (Directora de tesis: Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro).

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto estimulador de la Jalea Real (JR) de *Apis Mellifera* en ausencia de FSH sobre la expansión del cumulus de bovino durante la Maduración *in vitro* (IVM). La IVM del Complejo Cumulus-Ovocito (COC) de bovino se realizó con 10 mg/ml de JR o 20 µg/ml de FSH. Después de 4, 8, 12, 16 y 22 horas de IVM, las células del cumulus se les determinó la expresión de los marcadores de expansión AREG, EREG, EGFR, PTGS-2 y HAS-2 por PCR en tiempo real. Posteriormente se analizó la expresión relativa de MAPK 3/1p y AKT a través de Western-Blot. El porcentaje de expansión de los COCs en presencia de JR o FSH a las 22 horas de maduración no fue diferente ( $P > 0.05$ ). Los COC's cultivados con JR expresaron un incremento significativo de EREG y AREG a las 8 horas de maduración. En contraste, EGFR tuvo su máxima expresión a las 4 horas ( $P < 0.05$ ) y disminuyó gradualmente hasta las 22 horas, donde nuevamente se observó un incremento significativo. Por otro lado, la expresión de HAS-2 y PTGS-2 en presencia de JR presentó un incremento ( $P < 0.05$ ) a las 22 horas de maduración. Los COCs cultivados con JR expresaron MAPK 3/1 en mayor abundancia a las 16 horas y cuya expresión continuó aumentando hasta las 22 horas de maduración. En contraste, la expresión de AKT disminuyó a las 12 horas y se incrementó gradualmente su expresión hasta las 22 horas de maduración ( $P < 0.05$ ). Los resultados del presente estudio son los primeros en demostrar que la JR participa en la expansión de los COC de bovino en ausencia de FSH, a través de la vía EGFR-MAPK durante la IVM.

**Palabras clave:** Ovocito, bovino, IVM, FSH, Jalea real.

## INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha incrementado el interés por explorar el potencial que tiene la Jalea Real (JR) en los cultivos *in vitro* pues, se ha descubierto que algunos de sus componentes pueden estimular la proliferación y el desarrollo de las células de mamífero<sup>1-3</sup>. La JR es un compuesto natural producido en las glándulas hipofaríngeas y submandibulares de la abeja occidental *Apis mellifera*<sup>1</sup>. De esta manera, las abejas trabajadoras alimentan exclusivamente a las larvas con jalea real para permitir su metamorfosis en una abeja reina fértil<sup>4</sup>. Los componentes bioquímicos de la JR tales como los carbohidratos (7-18%), aminoácidos esenciales (Val, Leu, Ile, Tre, Met, Fen, Lis y Trp) y lípidos (3-8%)<sup>5,6</sup> son fundamentales para que la larva pueda desarrollarse pero, son las sustancias bioactivas como las proteínas mayores de la JR y el ácido 10-decanoico (10-HDA) las que estimulan la metamorfosis de la larva en abeja reina<sup>7</sup>.

En la actualidad no existen claras evidencias de que vías de señalización se encuentran involucradas para una exitosa prolificidad de la abeja reina, sin embargo, existe la hipótesis que señala que los compuestos proteicos y lipídicos que integran a la JR pueden participar en la vía de señalización mediada por el receptor a través del factor de crecimiento epidermal (EGFr) para activar el eje reproductivo en la abeja reina<sup>4</sup>.

Este interesante fenómeno ha abierto el camino para que investigadores de todo el mundo estudien los efectos de la JR en las células reproductivas de mamífero<sup>5,6,8-10</sup>. A este respecto, Amiri y sus colaboradores<sup>5</sup> determinaron que 10 mg/ ml de JR aumenta el porcentaje de ovocitos en MII<sup>5</sup>. Sus resultados también muestran que bajo esta dosis la expresión de los genes HAS-2 y PTGS-2 relacionados con la expansión de las células del cumulus mejoran,<sup>5,4</sup>. Esta serie de resultados son importantes ya que es bien conocido que la unión de la FSH a su receptor en las células del cumulus estimula la síntesis de Anfirregulina (AREG) y Epirregulina (EREG) a través de la activación de la ruta AMPc-PKA, durante las primeras horas de maduración y su posterior unión al EGFr, estimulando la



reanudación de la meiosis y la expansión del cumulus<sup>11,12</sup>. Otras investigaciones sugieren que los compuestos proteicos de la JR actúan como factores de crecimiento que estimulan las vías de señalización en el Complejo Cumulus-Ovocito (COC) para que el ovocito pueda continuar con su meiosis<sup>6</sup>.

<sup>13-16</sup>Esto es interesante dado que evidencias anteriores <sup>17</sup> describen que el cumulus de los COCs de bovino que no reciben FSH durante la IVM no se expande, es por tanto pensar la probabilidad de una proteína en la JR que tengan una función similar a FSH para iniciar la expresión de genes tempranos de maduración<sup>11,13,14</sup>. Paralelamente, el ovocito puede proseguir con la maduración nuclear, ya que la transferencia de los factores moleculares que mantienen el arresto meiótico del ovocito, y que provienen de las células del cumulus, se pierde cuando estas se expanden<sup>11</sup>. *Caixeta et al., 2013* demostraron que una concentración mínima de 10 ng/ml de FSH en el medio de IVM, estimula la expansión del COC`s de bovino al activar la vía de señalización intracelular EGFR-MAPK en las células del cumulus<sup>11,13,15</sup>. Es imposible que la expansión del cumulus y la maduración nuclear del ovocito ocurra sin que <sup>11</sup>AREG y EREG se unan al EGF-r, pues las Proteincinasas Activadas por Mitogenos (MAPK) 3/1 no podrían activarse para reanudar la meiosis del ovocito, ni la expansión del cumulus, proceso mediado por la Hialuronano-Sintasa 2 (HAS-2)<sup>16</sup>. MAPK 3/1 también promueve la expresión de Prostaglandina-Endoperóxido Sintasa 2 (PTGS2) en las células del cumulus para la síntesis de PGE2<sup>17</sup>. En resumen, la FSH estimula las vías de señalización en las células del COC`s, permitiendo la producción de prostaglandinas, la reanudación del proceso de meiosis y finalmente la expansión del cumulus<sup>11,18,19</sup>. Motivo por el cual AREG, EREG, PTGS2 y MAPK 3/1 son considerados indicadores de calidad del ovocito de bovino durante la IVM<sup>11,17,19,20</sup>.

Como se ha demostrado anteriormente<sup>5,6,8</sup>, el uso de JR mejoró el porcentaje de ovocitos en MII obtenidos al final de la IVM, estimularon la expresión de los genes relacionados con la expansión del cumulus (HAS-2, PTGS2) y también estimuló el metabolismo de la glucosa, proceso fundamental para la síntesis de ácido hialurónico durante la expansión del cumulus<sup>21</sup>. Sin embargo, la participación de la

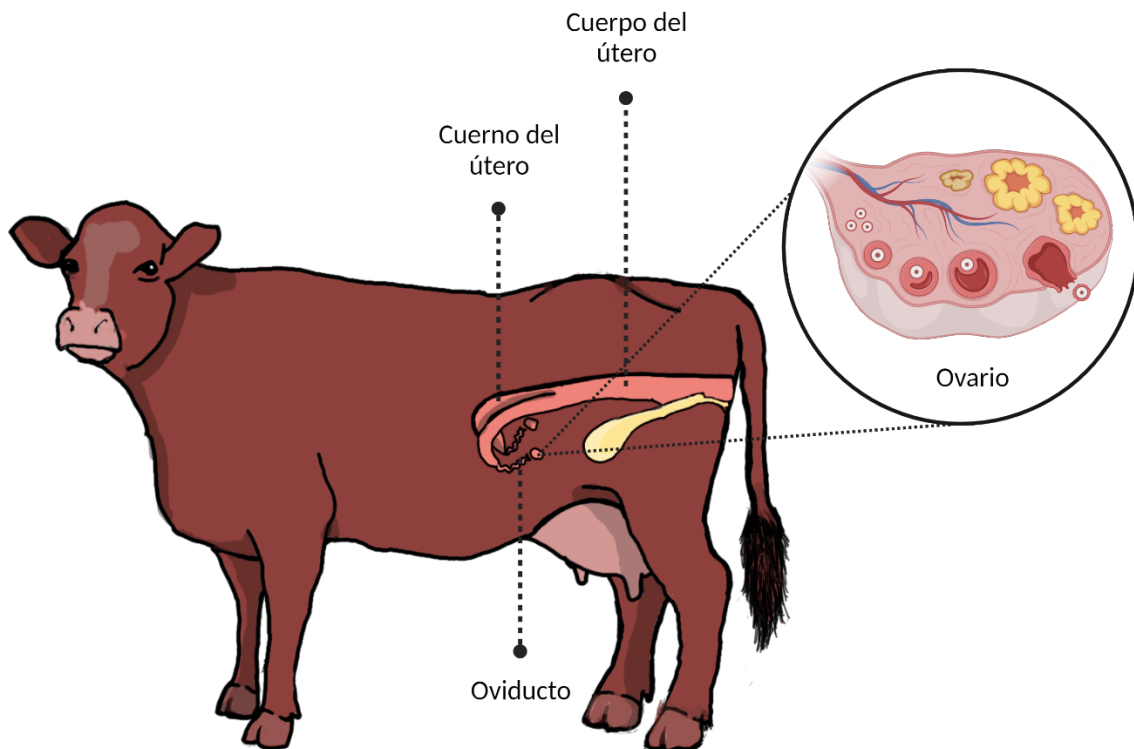
JR en las vías de señalización se durante la expansión de las células del cumulus en ausencia de los componentes hormales en el medio de IVM. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la participación de la JR en la estimulación de la expansión de las células del cumulus del COC de bovino en ausencia de FSH.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Anatomía y fisiología del ovario

#### 1.1 Anatomía

Los ovarios son los órganos reproductivos en muchas especie, poseen una función citógena y endocrina ya que producen los gametos femeninos y liberan las hormonas necesarias para llevar a cabo la reproducción<sup>22</sup>. En la especie bovina, los ovarios se ubican dentro de la región abdominal en posición dorso-craneal a la vejiga tomando como límite de referencia el borde craneal del hueso pubis o piso de la cavidad pelviana (Figura 1), poseen una forma oval con un tamaño que varía en rangos de 1.3 a 5 cm de largo por 1.3 a 3.2 cm<sup>23</sup>.



**Figura 1.** Situación anatómica del aparato reproductor de la vaca. Adaptado de Fails-Magee, 2018 en *Physiology of Domestic Animals* 8<sup>th</sup> Ed.

Estos órganos se encuentran cubiertos por un saco peritoneal denominado bursa ovárica la cual está formada por el mesovario y el mesosalpinx, mismos que forman parte del ligamento ancho del útero<sup>24</sup>. Cada ovario se encuentra adherido a su respectivo cuerno uterino a través del ligamento propio del ovario<sup>24</sup>. A partir del cuarto mes de gestación los ovarios se desplazan ventralmente dentro de la cavidad abdominal de forma paulatina a lo largo del crecimiento fetal<sup>23</sup>.

Estructuralmente el ovario está formado por una corteza y una médula<sup>22,23</sup>. En la corteza se encuentran los folículos y un conjunto de células intersticiales con función endócrina, ambos responsables de la producción de hormonas esteroidales cuya importancia depende del momento reproductivo en el que se encuentre la vaca<sup>22,23</sup>.

La irrigación sanguínea del ovario tiene su origen en la arteria ovárica que perfunde al ovario a través de sus ramas en la región medular, del mismo modo se encuentra la vena ovárica que lleva sangre del ovario hacia la circulación general<sup>22,25</sup>.

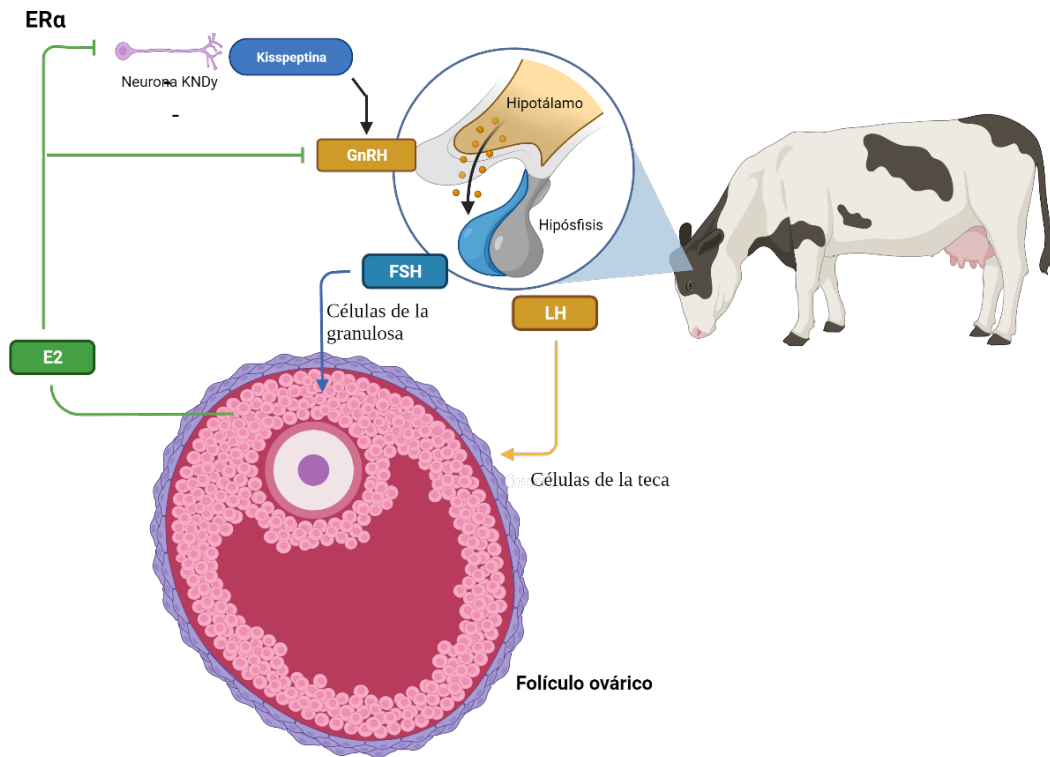
## **1.2 Control endócrino**

La actividad ovárica en bovinos está regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gonada <sup>26</sup>. El hipotálamo que se sitúa cerca de la línea ventral del diencefalo y secreta al sistema porta-hipotálamo-hipofisario a la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) cuya acción sobre las células gonadotrópicas de la adenohipófisis estimula la síntesis y liberación de dos hormonas trópicas de origen peptídico, la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Foliculoestimulante (FSH)<sup>26,27</sup>. El patrón de liberación de gonadotropinas es regulada o pulsátil y *constitutiva*, que está determinada por la secreción de GnRH desde el hipotálamo<sup>26</sup>. La naturaleza pulsátil de este fenómeno es fisiológicamente importante, ya que la continua secreción de GnRH no resulta en la secreción continua de FSH y LH (Figura 2)<sup>26,28</sup>.

En el caso de la FSH, la GnRH estimula su síntesis por medio de pulsos infrecuentes de GnRH <sup>28</sup>. Por otro lado, cuando se libera un pulso de GnRH desde

el hipotálamo la adenohipófisis responde con un pulso subsecuente de LH, mismo que incrementa en amplitud cuando la GnRH se secreta con mayor frecuencia<sup>28</sup>. Las gonadotropinas estimulan de manera secuencial el crecimiento folicular, la secreción de estrógenos, la maduración de los ovocitos, la ovulación, el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional y la secreción de progesterona (P<sub>4</sub>)<sup>28</sup>.

Aunque la GnRH es la principal hormona que regula la actividad de las células gonadotrópicas, otras hormonas también pueden modular su función, tal es el caso de la inhibina o la hormona inhibidora de gonadotropinas<sup>28</sup>.<sup>12</sup> Los estrógenos pueden ejercer retroalimentación positiva o negativa sobre la secreción de GnRH, lo cual depende de la etapa del ciclo reproductivo, por ejemplo, en becerras y vacas en anestro posparto, los estrógenos inhiben la secreción de GnRH, pero durante el proestro y el estro estimulan su secreción<sup>29</sup>. Los folículos ováricos maduros se encargan de producir Estradiol (E<sub>2</sub>) durante la esteroidogénesis aumentando las concentraciones circulantes hasta alcanzar su umbral 12 a 18 horas antes de que finalice el estro, desencadenando la liberación de un pulso preovulatorio de GnRH y, en consecuencia, la liberación de gonadotropinas, principalmente de LH (Figura 2)<sup>30</sup>.



**Figura 2.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal. Adaptado de Fails-Magee, 2018 en *Physiology of Domestic Animals* 8<sup>th</sup> Ed.

La ovulación ocurre aproximadamente 30 horas después de la secreción de LH y es seguida de un declive abrupto de las concentraciones de E<sub>2</sub>. Las células foliculares comienzan una transformación funcional a células lúteas que sintetizan y liberan P<sub>4</sub><sup>30</sup> misma que disminuye la secreción de GnRH, así como la respuesta de la hipofisis a la GnRH<sup>29</sup>. Las neuronas secretoras de GnRH no poseen receptores para estrógenos o P<sub>4</sub>, pero sí expresan receptores para el péptido Kisspeptina, es así como la Kisspeptina otorga la información necesaria a las neuronas secretoras de GnRH sobre las concentraciones circulantes de las hormonas sexuales (Figura 2)<sup>29</sup>.

### 1.3 Ciclo estral

Se conoce como ciclo estral al intervalo de tiempo entre dos ovulaciones o intervalo interovulatorio. La especie bovina presenta ciclos estrales durante todo el

año que pueden durar entre 17 y 24 días con un promedio de duración de 21 días siendo interrumpidos solamente durante el periodo de gestación o por alguna patología<sup>29,30</sup>. Debido a esta naturaleza, las vacas son clasificadas como poliéstricas continuas<sup>27</sup>. Con base en la actividad ovárica, el ciclo estral se divide en fase folicular o proliferativa y fase lútea o secretora. La primera engloba al proestro y al estro mientras que la segunda el metaestro y el diestro<sup>29,30</sup> (Figura 3).

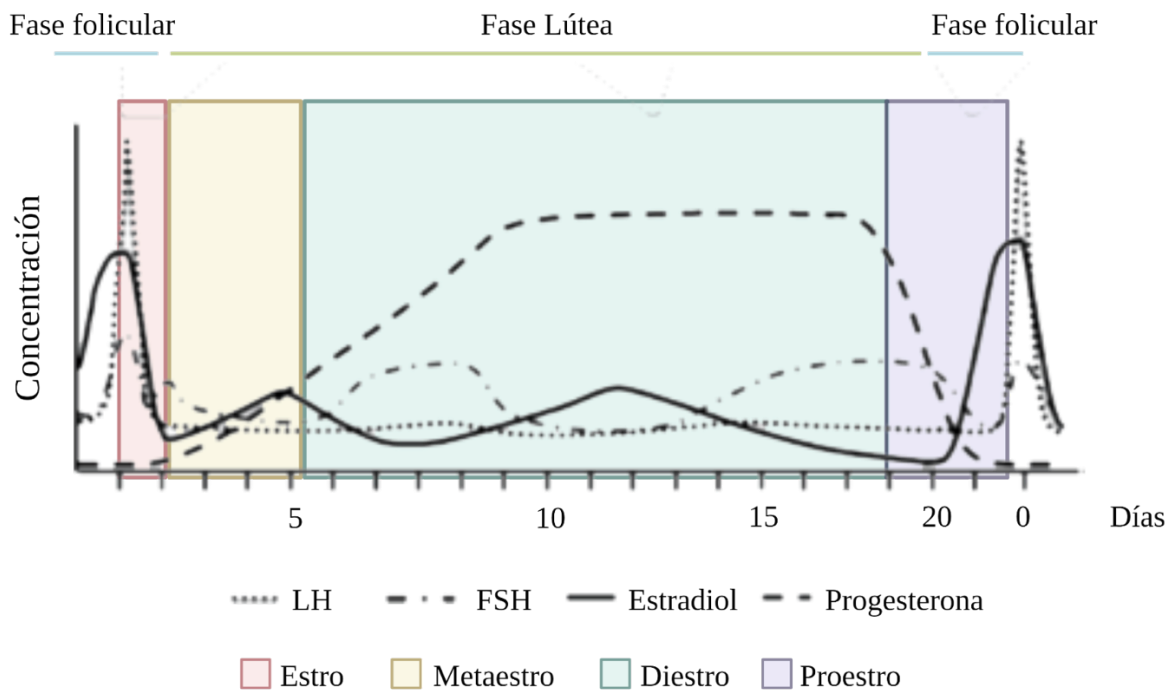


Figura 3. Ciclo estral del bovino. Modificado de *Amstadem & Williams* en *Bovine Reproduction*, 2015

El proestro tiene un rango de duración de 2 a 3 días, se caracteriza por la ausencia de un cuerpo lúteo funcional, así como por el desarrollo y maduración del folículo ovulatorio. Durante esta etapa se incrementa la frecuencia de los pulsos de secreción de FSH y LH, lo que conduce a la maduración del folículo ovulatorio y al incremento de E<sub>2</sub> circulante (Figura 3), momento en el que comienza el estro<sup>29,30</sup>.

El estro dura entre 8 y 18 horas. La vaca presenta cambios conductuales y anatómicos a lo largo de esta fase, los cuales se denominan conducta de estro. En las vacas sexualmente maduras el folículo dominante secreta grandes cantidades de E<sub>2</sub> generando un pulso continuo de GnRH, lo que permite una mayor amplitud de pulsos de LH hasta que esta hormona alcanza su máxima concentración circulante alrededor de las 6 horas de iniciado el estro<sup>30,31</sup> (Figura 3). Durante el comportamiento de estro podemos observar que las vacas son receptivas a la monta, presentan comportamiento homosexual y presentan edema en la vulva. A pesar de esto, cuando las vacas presentan su primer ciclo ovárico no poseen un cuerpo lúteo funcional ni hay secreción alguna de P<sub>4</sub> de modo que los signos de estro no se presentan<sup>31</sup>.

El metaestro tiene un intervalo de duración de 4 a 5 días. La ovulación ocurre entre las 8-16 horas posteriores a su inicio, el cual coincide con un incremento súbito de LH<sup>32</sup>. Después de la ovulación las células foliculares remanentes comienzan el proceso de luteinización dando origen al cuerpo lúteo<sup>29</sup>. Las concentraciones circulantes de P<sub>4</sub> aumentan conforme el cuerpo lúteo crece hasta que son superiores a 1ng/ml. Este momento se considera como el punto de corte que establece el final del metaestro y el comienzo del diestro<sup>30</sup> (Figura 3). A lo largo de esta etapa se presenta un pulso posovulatorio de FSH que desencadena la primera oleada del siguiente ciclo folicular<sup>29</sup>.

El diestro es el periodo más largo del ciclo estral con un rango de duración de 12 a 14 días. Entre los cambios anatómicos que se presentan durante esta fase encontramos que las glándulas uterinas se ramifican, el cérvix se cierra y las secreciones del tracto genital se vuelven más espesas mientras que, la mucosa vaginal se observa pálida<sup>33</sup>. Durante todo este periodo el cuerpo lúteo se mantiene secretando P<sub>4</sub><sup>29,30</sup> (Figura 3). Sí al finalizar el diestro no se desarrolla una gestación, el endometrio uterino secretará Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) para comenzar la lisis de las células lúteas, evento es conocido como regresión del cuerpo lúteo<sup>27</sup>. Al tejido fibroso remanente tras la presencia de un cuerpo lúteo en el parénquima ovárico se le denomina *corpus albicans* o cuerpo blanco<sup>34</sup>.



La regresión del cuerpo lúteo permite que la P4 disminuya y en consecuencia, que las concentraciones circulantes de FSH aumenten. El conjunto de estos eventos permite que nuevos folículos sean reclutados y estos comiencen su crecimiento<sup>27</sup>.

## 2. Fisiología del Folículo Ovárico

### 2.1 Foliculogénesis

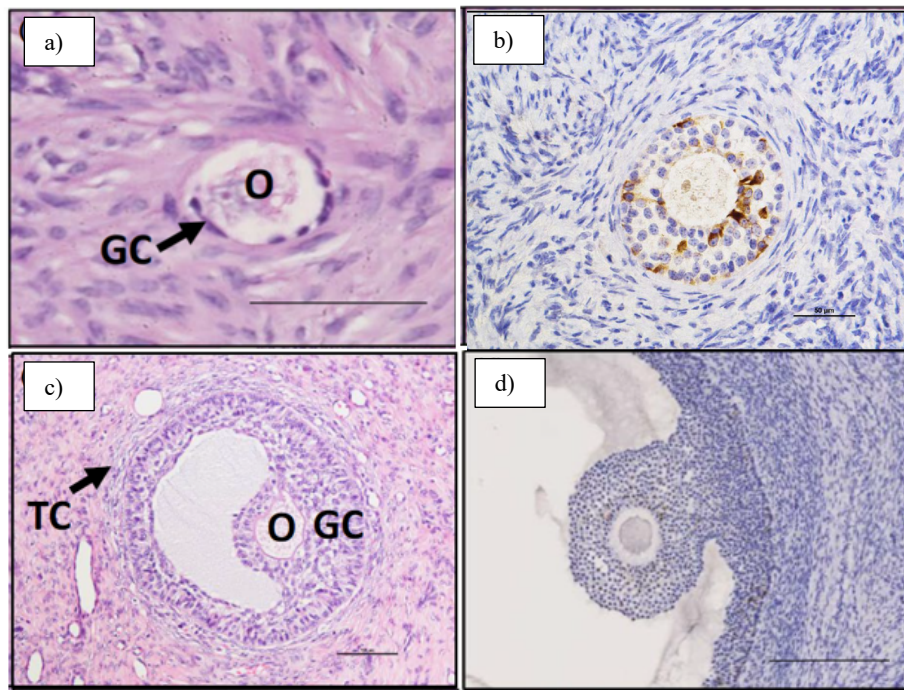
El folículo es la unidad funcional del ovario<sup>35</sup>, está compuesto por una o varias capas de células del estroma cortical ovárico, con función paracrina y yuxtacrina, que rodean al ovocito. Su función es establecer comunicación bidireccional con el ovocito a través de una compleja red de señalización, regulada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal<sup>35,36</sup>. El desarrollo folicular de la vaca inicia cuando las células planas del folículo primordial (Figura 4-a) modifican su estructura para formar una capa de células cúbicas. Las células comienzan a replicarse hasta originar una segunda capa de células, que responderán posteriormente a los estímulos de la FSH. A estas células completamente diferenciadas se les conoce como células de la granulosa<sup>11,14,36</sup>.

Durante su proliferación, las células de la granulosa y el ovocito secretan una membrana de glucoproteínas que forma la *zona pelucida*, misma que es atravesada por prolongaciones citoplasmáticas para mantener la comunicación bidireccional a través de uniones tipo hendidura o *gap*<sup>26,37,38</sup>. Simultáneamente, las células del estroma ovárico que rodean al folículo comienzan a proliferar y se determinan como las células endocrinas que forman la teca del folículo<sup>36,39</sup>. Cuando el folículo alcanza un tamaño aproximado de 4 mm de diámetro, se conoce como folículo secundario (Figura 4-b)<sup>35,36</sup>.

La LH se une a su receptor en las células de la teca estimulando la síntesis de androstenediona y testosterona<sup>30,40,41</sup>. Simultáneamente, la FSH se une a su receptor en las células de la granulosa estimulando su proliferación. Las células de la granulosa forman espacios llenos de líquido folicular, que posteriormente darán origen al antro del folículo<sup>11,30,33</sup>. En cada ciclo reproductivo, un folículo es

seleccionado y se vuelve dominante sobre el resto de los folículos reclutados, este libera únicamente un ovocito maduro<sup>30,41</sup>.

Las células de la granulosa del folículo dominante sintetizan y secretan inhibina, la cual ejerce retroalimentación negativa sobre la síntesis y secreción de FSH,. La retroalimentación negativa de la inhibina provoca que los folículos subordinados comiencen el proceso de regresión o atresia, mientras que el folículo dominante que ya es independiente de FSH continua su crecimiento<sup>28,42</sup>.<sup>35,42</sup>.



**Figura 4.** Características morfológicas de las células foliculares (bovino): a) folículo primordial, b) folículo primario, c) folículo secundario, d) folículo terciario y complejo cumulus-ovocito. CG: Células de la granulosa, TC: Células de la Teca, O: Ovocito. Tinción hematoxilina y eosina (a,c); tinción inmunohistoquímica (b,d). (Modificado de *Teh A et al, 2018*).

La última fase de desarrollo del folículo se encuentra regulada por la LH y el E<sub>2</sub>. Los receptores de LH inician su expresión en la membrana de las células de la granulosa (Figura 4-c)<sup>14,41</sup>. La unión de la LH a su receptor en las células de la granulosa estimula el proceso de mitosis. Las células de la granulosa se organizan hasta la total formación del antro folicular. Finalmente, el folículo dominante experimenta una fase de meseta en la que su crecimiento ya no es exponencial,

reduciendo la mitosis de sus células cuando el folículo alcanza un tamaño aproximado de 13 mm<sup>14,43</sup>. Paralelamente, las células que rodean al ovocito se diferencian en células del cumulus y, consolidan un sincitio con el ovocito a través de uniones gap, el cual ahora se denomina complejo cumulus-ovocito (COC) CITA. La comunicación entre ambos tipos celulares es importante ya que permite que se activen las vías de señalización necesarias para que el ovocito reanude su maduración antes de ser liberado del folículo (Figura 4-d)<sup>43,44</sup>. Las células de la granulosa del folículo dominante, ahora denominado preovulatorio o Graafiano, continúan la producción de E<sub>2</sub>, la cual ejerce retroalimentación positiva sobre el centro cíclico de las neuronas productoras de GnRH. En consecuencia, la frecuencia de secreción de LH aumenta progresivamente, hasta que llega a su máxima concentración circulante. Este fenómeno desencadena los procesos bioquímicos, moleculares y estructurales que permiten la liberación del COC del folículo durante la ovulación<sup>14,44</sup>.

## **2.2 Microambiente Folicular**

La composición del microambiente folicular es uno de los puntos críticos que determina la calidad final del ovocito al momento de la ovulación. El líquido folicular se forma a través de la secreción del fluido producido por las células foliculares y los compuestos extravasados de la circulación sanguínea<sup>45</sup>. El líquido folicular protege al COC a lo largo del proceso de extrusión durante la ovulación, actuando como un medio amortiguador contra los efectos de la sangre presente tras la ruptura del folículo<sup>46</sup>.

Los componentes del líquido folicular varían a lo largo de la foliculogénesis y en su conjunto tienen la finalidad de mantener el óptimo funcionamiento de las células del folículo a través de su interacción con diferentes vías de señalización, mismas que son necesarias para iniciar la maduración del ovocito (Cuadro 1).<sup>6,21,47,48</sup>

Primero encontramos a los sustratos energéticos, es decir la glucosa, el lactato y el piruvato, cuyas concentraciones pueden variar dependiendo del tamaño del folículo (Cuadro 1)<sup>48</sup>. Los sustratos energéticos son requerimientos indispensables durante el desarrollo de los ovocitos y es a través del metabolismo oxidativo del piruvato donde el ovocito adquiere la mayor cantidad de energía requerida a lo largo del proceso de maduración<sup>49</sup>.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (mM/L)</b>	
Glucosa	4.71 - 4.84 1.4 - 3.9 3.49 - 3.59	N.M. Osri et al, 2005 <sup>49</sup> J.G. Thompson et al, 2007 <sup>48</sup> N.L Hudson et al, 2014 <sup>50</sup>
Piruvato	0.01 - 0.3 0.4	N.M. Osri et al, 2005 J.G. Thompson et al, 2007
Lactato	8.16 - 5.09 14.4 - 3.0	N.M. Osri et al, 2005 J.G. Thompson et al, 2007
NEFAS	0.06-0.11	N.L. Hudson et al, 2014
Colesterol	1.43- 1.62	N.L. Hudson et al, 2014
Alanina	227	N.L. Hudson et al, 2014
Arginina	53	
Cisteina	0.25	
Cistina	79	
Glutamina	225	
Glicina	480	
Histidina	32	
Isoleucina	9	

Leucina	111	
Lisina	76	
Metionina	25	
Fenilalanina	51	
Prolina	82	
Serina	128	
Treonina	115	
Triptófano	20	
Tirosina	48	
Valina	220	

Cuadro 1. Concentración de los compuestos bioquímicos que se encuentran en el líquido folicular del folículo ovárico terciario (~10 mm) de la vaca.

El líquido folicular es rico en diferentes tipos de ácidos grasos no esterificados (NEFAS), cuya importancia impacta la competencia del ovocito durante los periodos de balance energético negativo en vacas altas productoras de leche (Leroy et al 2005). Sin embargo, estudios previos han determinado que no son los ácidos grasos sino los aminoácidos que se encuentran en el líquido folicular los que se relacionan con la competencia de desarrollo del ovocito, ya que estimulan las vías de señalización que permiten la reanudación de la meiosis<sup>16,39,51-53</sup>. A diferencia de otros compuestos, la concentración de aminoácidos se mantiene constante a lo largo de la foliculogénesis<sup>54</sup>.

La presencia de hormonas en el líquido folicular es esencial ya que estimulan la función de las células foliculares<sup>20,35,36</sup>. Entre las hormonas más importantes se pueden enlistar a las hormonas esteroidales producto de la esteroidogénesis en el folículo<sup>55</sup> (Cuadro 2).

Hormona	Concentración (ng/ml)		
	Folículo pequeño	Folículo mediano	Folículo grande

Progesterona	326.25 ± 215.27	312.85 ± 206.35	58.18 ± 43.38
Testosterona	27.34 ± 19.20	31.12 ± 17.20	74.12 ± 12.23
Estradiol	33.28 ± 16.17	47.24 ± 10.13	63.74 ± 27.89

Cuadro 2. Concentración de hormonas sexuales esteroidales dentro del líquido folicular de la vaca (Modificado de *Tabatabaei S et al., 2011*).

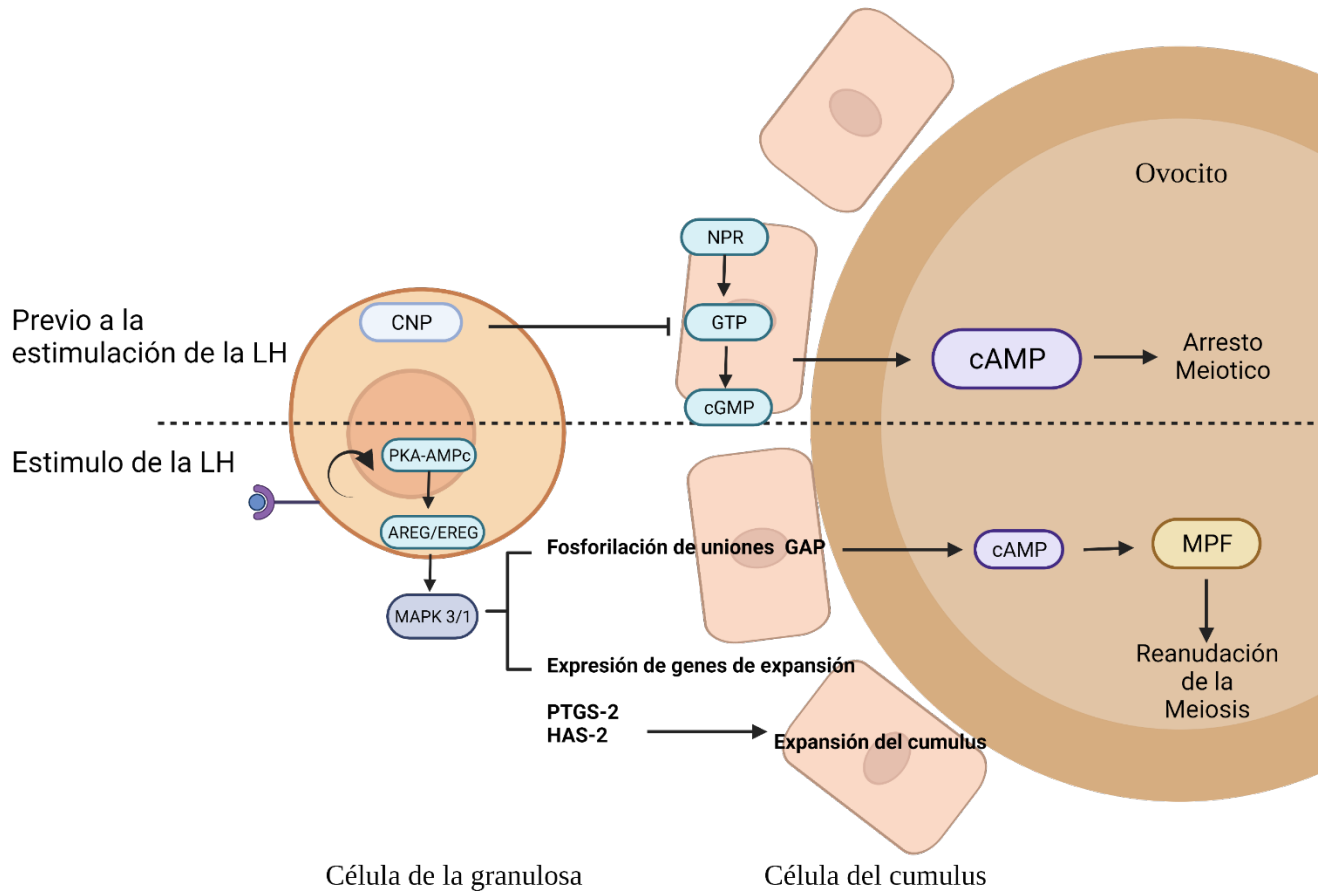
### 2.3 Maduración del ovocito

A las 16 semanas del desarrollo embrionario del bovino, las ovogonias ya colonizaron las crestas gonadales, comenzaron su meiosis y se detuvieron en la fase de diploteno de la Profase I o fase de Vesícula Germinal (VG), conocida de este modo porque el núcleo del ovocito mantiene íntegra su membrana<sup>14,17,37</sup>. Durante esta fase, el ovocito se encuentra rodeado por células somáticas planas, que posteriormente se diferenciarán en células de la granulosa y células del cumulus a lo largo de la foliculogénesis<sup>42</sup>.

El desarrollo del ovocito depende de su estrecha comunicación con las células del cumulus<sup>37</sup>. Ambas células forman un sincitio funcional a través de uniones GAP conocido como Complejo Cumulus-Ovocito (COC)<sup>38,56</sup>. La comunicación paracrina entre las células del cumulus y el ovocito es importante para que adquiera su competencia de desarrollo pues se ha demostrado que los ovocitos que son aislado de sus células del cumulus no pueden concluir la maduración nuclear y, en consecuencia, no pueden ser fertilizados<sup>57,58</sup>. Diferentes autores coinciden en que el ovocito permanece en fase de VG debido a la alta concentración de AMPc en su citoplasma, estimulada por los receptores transmembranales del ovocito (Figura 5)<sup>18,59,60</sup>.

La maduración nuclear se reanuda en la pubertad, cuando comienza la síntesis y liberación de gonadotropinas. Durante las últimas etapas del desarrollo folicular, la LH se une a su receptor en las células somáticas permitiendo que se active la vía de señalización PKA-AMPc-PDE3, ocasionando que la concentración de AMPc dentro del ovocito disminuya súbitamente<sup>60</sup> (Figura 5). En consecuencia, el Factor

Promotor de la Metafase (MPF) es activado y permite la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), momento en el que se asume que la meiosis se ha reanudado<sup>61</sup>.



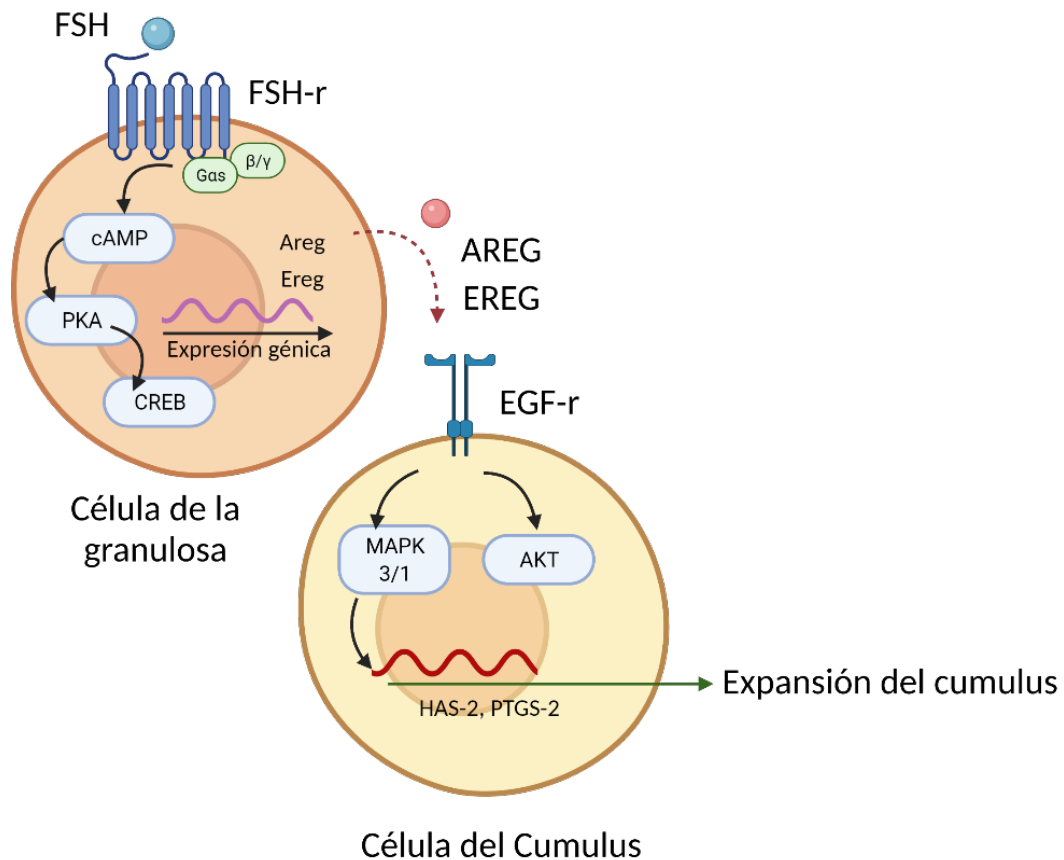
**Figura 5.** Mecanismos celulares que restringen y promueven la maduración nuclear del ovocito de bovino. (Modificado de Ruiz-Gálvez K, 2021).

## 2.4 Expansión del cumulus

Las células del cumulus que rodean al ovocito inmaduro juegan un papel crítico para el desarrollo del ovocito. Una de sus funciones es canalizar metabolitos y nutrientes al ovocito para ayudar a estimular la GVBD y dirigir su desarrollo a

metafase II<sup>62</sup>. De hecho, uno de los primeros indicadores morfológicos que indican una maduración exitosa del ovocito es la expansión del cumulus<sup>21,63,64</sup>.

La expansión del cumulus es resultado del crecimiento del espacio intercelular debido al aumento en la síntesis de matriz extracelular, compuesta principalmente de ácido hialurónico<sup>21,57,63</sup>. Cuando la FSH se une a su receptor en las células de la granulosa activa la vía de señalización AMPc-PKA, la cual finaliza con la transcripción y traducción de AREG y EREG<sup>11,12,61</sup>. Posteriormente, ambas proteínas se unen al receptor de EGF en las células del cumulus (Figura 6)<sup>11,56</sup>.



**Figura 6.** Vía de señalización inducida por la FSH durante la expansión de las células del cumulus. (Modificado de *Shimada M et al, 2013*, en *Oocyte Physiology and Development*).

La unión de AREG y EREG al EGF-r desencadena la fosforilación de MAPK 3/1, la cual se encarga de regular la transcripción de los genes HAS-2 y PTGS-2, ambos



involucrados en la síntesis e incorporación de ácido hialurónico a la matriz extracelular de las células de cumulus (Figura 6)<sup>17,52</sup>.

Durante la expansión, las uniones gap entre el ovocito y las células del cumulus son fosforiladas, interrumpiendo su comunicación e impidiendo la transferencia de los factores que permiten el arresto meiótico<sup>12,60</sup>. Este mecanismo autocrino se mantiene activo hasta que todas las capas de células que rodean al ovocito están completamente expandidas<sup>31,48,65,66</sup>.

### **Maduración *In Vitro* (IVM)**

La Maduración In Vitro (IVM) es una práctica rutinaria para la producción *in vitro* de embriones de bovino<sup>62</sup>, consiste en la maduración artificial de Complejos Cumulus-Ovocito (COC) con la capacidad de desarrollarse normalmente<sup>52</sup>. Sin embargo, el óptimo desarrollo del COC depende principalmente del medio de maduración utilizado durante la IVM, ya que la transición del ovocito en estado de profase I a metafase II requiere de una fuente adecuada de hormonas sexuales y también exige un alto consumo de nutrientes que deben ser adicionados al medio base<sup>48,52,67</sup>.

La IVM es el primer paso para poder realizar la Fertilización *In Vitro* (IVF), por lo que es fundamental evaluar la morfología del COC antes de realizar la IVM pues sólo el COC con un citoplasma y núcleo integros pueden ser fertilizados con éxito y en consecuencia dar origen a un embrión sano<sup>54,68,69</sup>. A continuación, se describen los elementos necesarios para que el COC de bovino se desarrolle adecuadamente.<sup>55</sup>

#### **3.1 Medio de Maduración**

La fisiología del COC ha sido descrita a lo largo de muchos años a través de experimentos *in vitro*, siendo este removido de su microambiente natural en el folículo y transferido a un medio de maduración artificial o medio de cultivo<sup>18,61</sup>. El

medio de maduración más utilizado para la IVM es el TCM199, esto se debe a que, si bien posee diferencias sustanciales con el medio folicular, está diseñado para dar un soporte base al desarrollo del ovocito (Cuadro 3)<sup>50</sup>.

<b>Compuesto</b>	<b>TCM199</b>	
	<b>Concentración</b>	<b>Unidades</b>
Alanina	281	μMol/L
Arginina	332	
Cisteina	0.56	
Cistina	108	
Glutamina	685	
Glicina	667	
Histidina	104	
Isoleucina	305	
Leucina	458	
Lisina	383	
Metionina	101	
Fenilalanina	152	
Prolina	348	
Serina	238	
Treonina	252	
Triptófano	49	
Tirosina	222	
Valina	214	
Glucosa (Dextrosa)	1000	mg/L
Colesterol	0.2	mg/L
CaCl2	200	mg/L
MgSO4	97.67	
KCL	400	
NaCl	6100	
NaHCO3	2200	

Cuadro 3. Concentración de los compuestos bioquímicos que se encuentran en el medio de maduración TCM 199 (ThermoFisher Scientific).

Diferentes autores han concluido que para poder estimular el desarrollo del ovocito es esencial un microambiente artificial similar al que se encuentra en el folículo<sup>46,49,70</sup>. Aunque se ha logrado un mejoramiento en la eficacia de los protocolos de IVM, hay una falta de consistencia en el porcentaje de ovocitos en MII aptos para ser fertilizados si se compara con los ovocitos madurados in vivo<sup>71</sup>.

### **3.2 Sustratos energéticos**

El ovocito requiere de grandes cantidades de energía para mantener su metabolismo, por lo que es necesario adicionar sustratos energéticos que puedan ser aprovechados adecuadamente por el ovocito<sup>48</sup>. Las células del cumulus poseen la habilidad de consumir grandes cantidades de glucosa y de este modo proveer al ovocito con sustratos metabólicos a través de las uniones gap<sup>52</sup>. El metabolismo de la glucosa es un marcador importante de desarrollo del ovocito, pues se sabe que además de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato se sobreexpresa durante la formación de matriz extracelular en la expansión del cumulus<sup>6,21,47,52</sup>.

El TCM199 está suplementado con glucosa como fuente de energía, pero su concentración no es suficiente para mantener el desarrollo del ovocito (REF). Se ha investigado ampliamente el uso de piruvato de sodio como sustrato energético y diferentes autores han concluido que su adición al medio de cultivo es esencial para que el ovocito pueda reanudar la meiosis<sup>72</sup>. Cuando los COC son cultivados en un medio de IVM libre de glucosa suplementado con 5.0 mM de piruvato de sodio, tienen una mayor tasa de reanudación de la meiosis (95.9%) y la mayoría de estos logra llegar al estado de MII<sup>73</sup>.

Diferentes autores han estudiado el uso del lactato y la albumina sérica bovina como fuente de energía, sin embargo, sus resultados muestran que dichos

sustratos no son capaces de cubrir la demanda energética que exige el desarrollo del ovocito<sup>52,74</sup>.

### **3.3 Suplementación con hormonas**

La suplementación del TCM199 con hormonas es esencial para que los procesos de desarrollo y maduración sean estimulados<sup>64</sup>. El uso de gonadotropinas de origen animal fue adoptado para la IVM desde sus primeras fases y se continúa investigando cómo optimizar su funcionamiento en los protocolos más recientes<sup>71</sup>. La FSH se utiliza en la mayoría de los protocolos de IVM ya que es capaz de estimular los procesos de maduración nuclear y expansión de las células del cumulus<sup>13,67</sup>. La concentración que se agrega al medio de cultivo puede variar de acuerdo con el laboratorio, sin embargo, se ha reportado que 1 ng/ml de FSH son suficientes para que los ovocitos de bovino puedan reanudar su meiosis<sup>11</sup>.

La LH es importante para que la reanudación de la meiosis del ovocito y la expansión del cumulus ocurran al final maduración, también optimiza la fertilización y el desarrollo embrionario<sup>40,41</sup>. Esto se debe a que la LH activa las vías de señalización intracelulares que permiten la expresión de genes relacionados con la reanudación de la meiosis y la expansión del cumulus. Para estimular el desarrollo de los ovocitos se utiliza la dosis de 10 ug/ml de LH durante la IVM. Esta reportado que la maduración del ovocito es similar cuando ambas gonadotropinas se usan de forma independiente, pero, al usarse en conjunto se incrementa el porcentaje de clivaje de los embriones<sup>75</sup>.

### **3.4 Suero Fetal Bovino**

La fuente más común de proteínas durante la IVM es el Suero Fetal Bovino (FBS) ya que contiene proteínas de transporte de baja afinidad y es rico en componentes como son: esteroides, vitaminas, ácidos grasos y colesterol<sup>76,77</sup>.

El FBS se obtiene de la sangre de fetos de bovino, lo que vuelve inconveniente su uso pues es una potencial fuente de contaminación viral y bacteriana lo que vuelve obligatorio el uso de antibióticos de amplio espectro que impidan el crecimiento bacteriano en el medio de IVM, además de tener conflictos éticos por su método de obtención<sup>78</sup>. Otros conflictos técnicos el FBS suprime la función del Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ -1, lo que reduce la tasa de ovocitos maduros en todas las especies, también contiene endotoxinas que pueden interferir con el desarrollo embrionario después de que el ovocito es fertilizado<sup>10,76</sup>.

#### **4. Uso de Jalea Real en la IVM**

##### **4.1 Propiedades bioquímicas de la Jalea real**

En años recientes ha incrementado el interés por utilizar productos de la colmena en la investigación biomédica<sup>79</sup>. La Jalea Real (JR) es un producto natural que se ha utilizado anteriormente como reemplazo del FBS en los cultivos *in vitro* de células de mamíferos<sup>10,77</sup>.

La JR es producida en las glándulas hipofaríngeas y submandibulares de la abeja europea *Apis mellifera*. Una colmena sana de *Apis mellifera* puede producir entre 2 y 5 kg de JR al año<sup>80</sup>. Las larvas de *Apis mellifera* son alimentadas exclusivamente con JR hasta el final de su periodo larvario permitiendo su metamorfosis en abejas reinas fértiles y longevas<sup>2</sup>. La JR de *Apis mellifera* es un producto de alto valor nutricional ya que, aunque se encuentra compuesta en su mayoría por agua (60-70%), posee carbohidratos (7-18%), proteínas (9-18%) incluyendo aminoácidos esenciales (Val, Leu, Ile, Tre, Met, Fen, Lis y Trp) y lípidos (3-8%)<sup>79</sup>. Los componentes de la JR mejor caracterizados son las proteínas y los lípidos, pues han demostrado ser útiles para estimular la proliferación y el crecimiento de células de mamíferos<sup>2,3</sup>.

Se sabe que la metamorfosis de larva a reina está mediada por la acción de la familia de las Proteínas Mayores de la Jalea Real (MRJP), las cuales constituyen entre el 80-90% del total de contenido proteico de la JR<sup>3,10,81</sup>. Existe la hipótesis de que la vía de señalización que regula la metamorfosis de la abeja reina está

mediada por la unión de dichas proteínas al Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF-r)<sup>81</sup>. Por otro lado, estudios recientes reportan que las proteínas de la jalea real actúan como factores de crecimiento en las células de mamíferos, permitiendo su proliferación *in vitro* a través de distintas vías de señalización mediadas por el EGF-r<sup>10,79</sup>.

La mayoría de los lípidos en la JR son ácidos grasos, en su mayoría en forma libre y raramente esterificados<sup>2</sup>. El Ácido 10-Hidroxi-2-Decanoico (10-HDA) es el componente lipídico de la JR y es un considerado un compuesto estable representando 3.5% del peso seco de la JR, lo que se considera como un estándar internacional de calidad<sup>2,82</sup>. El 10-HDA actúa como inductor de la apoptosis en células cancerígenas y puede modular las vías de señalización relacionadas con la inflamación en modelos *in vitro* del sistema nervioso, también se ha demostrado que el 10-HDA posee actividad antimicrobiana e inmunomoduladora<sup>3,79</sup>.

En estudios anteriores se demostró que la JR contiene también hormonas como la progesterona, el estradiol y la testosterona en diferentes concentraciones, mismas que pueden ser aprovechadas para el cultivo *in vitro* de células ováricas<sup>83</sup>.

<b>Hormona</b>	<b>Concentración (ng/ml)</b>
Estradiol	5.4
Testosterona	6.76
Progesterona	17.79

Cuadro 4. Concentración de hormonas sexuales esteroidales en la Jalea Real (Castro-Chávez N 2019).

Otros componentes importantes de la JR son los carbohidratos que constituyen el 30% de su peso seco, entre los más importantes encontramos fructosa, glucosa y

sacarosa<sup>79</sup>. También se ha demostrado que la JR mejora el metabolismo de la glucosa<sup>6</sup>.

Finalmente, la JR también contiene hierro, zinc, cobre y potasio, así como un gran contenido de vitaminas de complejo B<sup>79</sup>.

#### **4.2 Jalea Real como reactivo durante la IVM**

Las propiedades bioquímicas de la JR se han comenzado a aprovechar para el cultivo *in vitro* de células de mamífero<sup>79</sup>. La JR ha demostrado regular el crecimiento y proliferación *in vitro* de células humanas del sistema inmune a través de Caspasa 3, la familia de las Proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la Proteincinasa B (AKT)<sup>2</sup>.

En otro estudio se evaluó el funcionamiento de la JR para sustituir el Suero Fetal Bovino (FBS) en el cultivo *in vitro* de células de origen humano. Sus resultados muestran con éxito que las proteínas de la JR pueden sustituir al FBS permitiendo el crecimiento de células renales humanas<sup>10</sup>. Por otro lado, estudios indican que la adición de JR al medio de cultivo está relacionada el aumento de la viabilidad celular en el cultivo *in vitro* de células hepáticas de rata, reflejado en el aumento de la síntesis de DNA para la producción de albúmina<sup>1,84</sup>.

La JR se ha utilizado para la IVM en distintas especies. Está reportado que la adición de 10 mg/ml de JR al medio de maduración permite que los ovocitos de ovino lleguen al estado de MII, aumentando también la expresión de HAS-2 y PTGS-2, ambos genes relacionados con la expansión de las células del cumulus<sup>5,6</sup>. De igual manera la JR está relacionada con el incremento en el consumo de glucosa y la activación de los mecanismos celulares que regulan la apoptosis y previenen el estrés oxidativo ocasionado por las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)<sup>5 66</sup>.

En otro estudio realizado con COCs de cabra, los resultados muestran que la adición de 5mg/ml de JR al medio de maduración es suficiente para estimular la expansión del cumulus (54.7%). Sin embargo, fue la dosis de 10 mg/ml con la que obtuvo un mayor número de ovocitos en MII ( $88\pm 1.7$ )<sup>8</sup>

Si bien hay evidencia de que los componentes de la JR en conjunto con los componentes tradicionales del medio de IVM incrementan el porcentaje de ovocitos en MII, se desconoce qué vías de señalización son estimuladas durante la expansión de las células del cumulus en presencia de JR.



## **JUSTIFICACIÓN**

La jalea real a través de sus componentes bioquímicos y como un compuesto natural se ha utilizado para sustituir reactivos como el suero fetal bovino (FBS) en los medios de Maduración *in vitro* (IVM) . Por este motivo resulta importante estudiar, en la medida de lo posible, los efectos de cada componente de la JR durante la IVM de ovocitos de bovino, es decir, determinar si su uso es viable como reemplazo para compuestos hormonales más delicados como la FSH.

## **HIPOTESIS**

La Jalea Real incrementa la expansión del complejo cumulus-ovocito de vaca en ausencia de FSH a través de la vía de señalización EGFr-MAPK.

## **OBJETIVOS**

Determinar el efecto de la Jalea Real en la expansión del complejo cumulus-ovocito de vaca en ausencia de FSH.

Objetivos específicos

- a)** Determinar el porcentaje de expansión de los COC`s después de 22 horas de IVM en un medio de maduración con suplementado con Jalea Real o FSH.
- b)** Determinar la expresión relativa de RNAm de EREG, AREG, EGF-r, PTGS-2 y HAS-2 a través de PCR en tiempo real para los tiempos 4, 8, 12, 16 y 22 de IVM.
- c)** Determinar la abundancia de MAPK 3/1 y AKT a través de Western Blot para los tiempos 4, 8, 12, 16 y 22 de IVM.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se realizó en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas, México y en el Centro de Investigación en Reproducción y Fertilidad (CRRF) de la Universidad de Montreal, Canadá.

### **Recolección de los Complejos Cumulus-Ovocito**

Los reactivos utilizados en el presente estudio se adquirieron de la empresa Sigma-Aldrich (Toluca, México; Oakville, Canadá), a menos de que se indique lo contrario.

Los ovarios de bovinos se obtuvieron en el rastro TIF de Fresnillo, Zacatecas y se transportaron al laboratorio dentro de contenedores aislantes a 35-37°C con solución salina (NaCl 0.9%) en un periodo no mayor a 40 minutos. Una vez ingresados los ovarios al laboratorio se lavaron de 3 a 5 veces con solución salina (NaCl 0.9%) adicionada con gentamicina. Los COC's se recuperaron aspirando folículos de 2-8 mm de diámetro con una aguja de calibre 18G y se colocaron en una caja de Petri con medio de recuperación TCM199 que contenía 50 µg/ml gentamicina. Los COC's seleccionados para este estudio contenían un citoplasma homogéneo, membrana celular íntegra y por lo menos 3 capas de células del cumulus.

### **Maduración *in vitro***

Los COC's seleccionados para su maduración se colocaron en medio base: TCM199 con sales de Earl (Invitrogen, Ref. 11150059) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 172 mmol/ml de estreptomicina, 22 µg/ml de piruvato (Invitrogen, Ref. 11360070) y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Ref. 10437028). Para la IVM de los COC's del grupo control negativo se utilizó únicamente el medio base. Para los COCs del grupo control positivo estos se

colocaron en el medio base en presencia de 20 µg/ml de FSH ovina, mientras que para los COCs del grupo experimental se les colocó 10 mg/ml de Jalea Real.

El porcentaje de expansión de los COC's se determinó en un total de 10 ovocitos por tratamiento, distribuidos cada uno en gotas de 50 µl de medio para IVM con FSH (Control positivo), con JR (Experimental) y sin FSH ni JR (Control negativo). Cada gota fue cubierta con aceite mineral se incubó en una atmósfera húmeda a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> durante 22 horas. Cada cultivo se repitió cuatro veces.

Para estudiar el efecto de la JR sobre la expresión del RNAm de EREG, AREG, EGFR, PTGS2, HAS2 y las proteínas MAPK y AKT se realizó otro cultivo donde 10 COCs distribuidos en gotas de 50 µl fueron sometidos a IVM durante 4, 8, 12, 16 y 22 horas en las mismas condiciones de incubación mencionadas en el párrafo anterior. Se repitió cada cultivo cuatro veces para cada uno de los tiempos.

### **Evaluación de la expansión del cumulus**

La evaluación de la expansión del cumulus se determinó a las 22 horas de incubación de acuerdo a la tabla de clasificación descrita por Machado et al., 2015. En breve: Expansión grado 1 (G1) correspondió a los COCs con pocos cambios morfológicos, expansión grado 2 (G2) se refiere a aquellos COC's que sufrieron una expansión parcial y expansión grado 3 (G3) se estableció en aquellos COCs que presentaron una expansión total de las células del cumulus, incluyendo la corona radiata (Resultados en ANEXO 1). Para efectos del presente estudio, sólo se muestran los resultados para los COCs con grado de expansión 3. Una vez evaluada la expansión del cumulus, los COCs se separaron en grupos de 5 y se almacenaron en tubos de microcentrífuga a -80°C.

### **PCR en Tiempo Real.**

El ARN total de cada grupo de 5 COC's se extrajo con el estuche comercial PicoPure™ RNA Isolation (Arcturus Bioscience Inc, Ref.12204-01) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se convirtió en ADN complementario

utilizando el Kit Superscript IV VILO Master Mix (Invitrogen, Ref.11756500). La PCR cuantitativa se realizó con SsoAdvance™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc. Ref.172-5274), las condiciones del termociclador fueron de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C (CFX96™ Real Time System, Bio-Rad Laboratories, Inc). Se utilizaron dos genes de referencia (H2AFZ y YWHAZ) y los resultados se evaluaron a través del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  85. La secuencia para los genes de referencia y los genes objetivo está especificada en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Secuencia de los primers utilizados en el presente estudio. F: Forward (3'-5') R: Reverse (5'-3').

Primer	Secuencia
YWHAZ	F: ACC AAC ACA CAT CCT ATC AGA C R: CTC TCA GTA ACT GCA TTA TTA GC
H2AFZ	F: GAG GAG CTG AAC AAG CTG TTG R: TTG TGG TGG CTC TCA GTC TTC
AREG	F: TAG CTG CTT TCG TCT CTG CC R: TCG TCT TCG AAG CAG GAT TGT
EREG	F: ACT GCA CAG CAT TAG TTC AAA CTG A R: TGT CCA TGC AAA CAG TAG CCA TT
EGFR	F: AAAGTTTGCCAAGGGACAAG R: AAAGCACATTTTCCTCGGATG
PTGS2	F: GTG AAA ACT GTA CCA CAC CCG A R: ACT GTG TTG GGA GTG GGT TT
HAS2	F: TGA CCA AGA GCT GAA CAA GAT GC R: TCC AAG GAG GAG AGA GAC TCC

### Western-Blot.

Cada grupo de 5 COC's fue lisado con 60 µl de amortiguador RIPA (PBS 1X, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, inhibidor de proteasas y fosfatasas) utilizando una micropipeta. Cada homogenizado se centrifugó a 10,000 x g, el sobrenadante se separó y el boton celular se eliminó. La separación electroforetica (SDS-PAGE) de las proteínas de cada extracto se determinó en geles al 12% para el gel separador y el 5% para el gel concentrador. Para el

desarrollo de la electroforesis se colocaron 15  $\mu$ l de muestra por pozo y se aplicó un amperaje constante, con 110 V por 40 minutos. Al termino, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana LF-PVDF (Immunoblot® Bio-Rad Laboratories, Inc) con un un sistema de transferencia húmedo (Mini Trans-Blot® Bio-Rad Laboratories, Inc) a 4°C durante toda la noche (16 horas). Posteriormente, cada membrana se bloqueó con TTBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) en ausencia de albumina y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Al termino del bloqueo, la membrana se lavó cinco veces con TTBS, donde cada lavado duro cinco minutos. Finalmente cada membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: MAPK-t (Proteincinasa Activada por Mitogenos Total) 3/1 (1:1000), MAPK-p (Proteincinasa Activada por Mitogenos Fosforilada) 3/1 (1:1000),  $\beta$ -actina (ACTB) (1:1000) o AKT-p (Proteincinasa B) (1:250) (Cell Signaling Technology) y se procedió con una incubación a 4°C durante 16 horas. Una vez concluido este último paso, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10,000) conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con TTBS. Finalmente, la señal fue detectada por quimioluminiscencia con ECL (QuemiDoc™ MP System, Bio-Rad Laboratories, Inc). La  $\beta$ -actina se utilizó como proteína de referencia con el fin de verificar la homogeneidad en la concentración de proteína de cada muestra.

### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron a través de un diseño completamente al azar utilizando el paquete estadístico JMP® Pro-14.3.0 (SAS Insitute Inc. 2018). Se realizó la tranformación de los datos de porcentaje de expansión a través de la función ARCsine para normalizar los datos y realizar el análisis estadístico. Se compararon las medias de los datos de expansión de los grupos Control, FSH y JR a través de un ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey Kramer HSD.

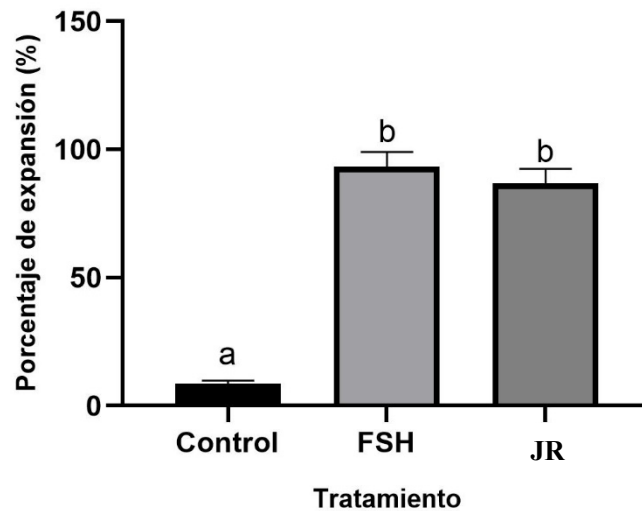
Los datos obtenidos de los ovocitos cultivados con JR en diferentes puntos de tiempo (4, 8, 12, 16, 22), que incluyen los resultados de PCR en Tiempo Real y Western Blot, fueron analizados con un ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey HSD.



## RESULTADOS

### Porcentaje de expansión de las células del cumulus.

El porcentaje de expansión de los COC's en grado 3 después de 22 horas de IVM se presenta en la Figura 7. Como se aprecia los COC's cultivados con 20 µg/ml de FSH o 10 mg/ml de JR no mostraron diferencia significativa ( $P>0.05$ ), sin embargo, al comparar el porcentaje de expansión de estos grupos con el control negativo se observó un incremento ( $p<0.05$ ).

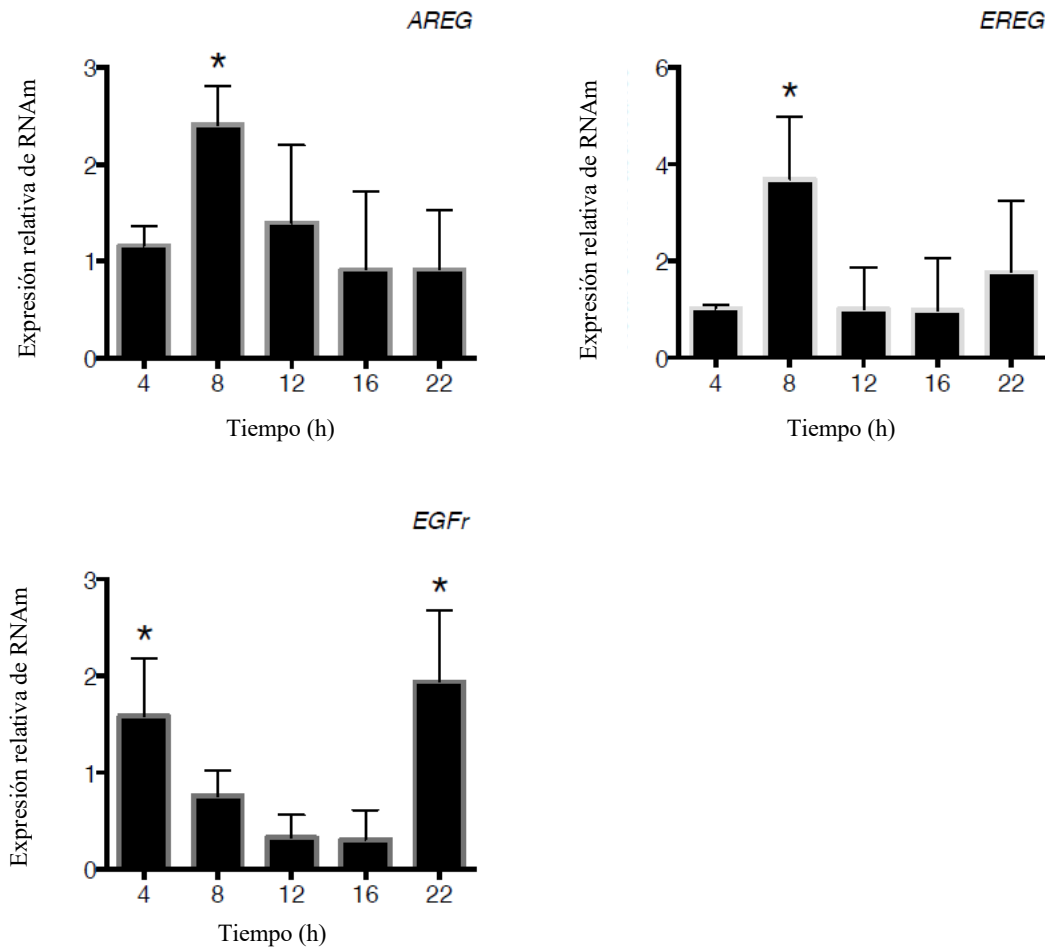


**Figura 7.** Efecto de la Jalea Real en el porcentaje de expansión (grado 3) del complejo cumulus-ovocito a las 22 horas de MIV. Los datos presentan el promedio  $\pm$  D.E. Las letras "a" y "b" indican diferencias ( $P<0.05$ ).

### Marcadores de maduración temprana.

La expresión de EREG y AREG en COC's cultivados con JR se presenta en la figura 8, como se aprecia, en ambos casos la mayor expresión se observó a las 8 horas de incubación, comparado con los otros tiempos ( $P<0.05$ ). Adicionalmente, EGFR se expresó mayormente ( $P<0.05$ ) a las 4 horas de maduración y disminuyó significativamente hasta las 16 horas de maduración ( $P<0.05$ ), tiempo después a

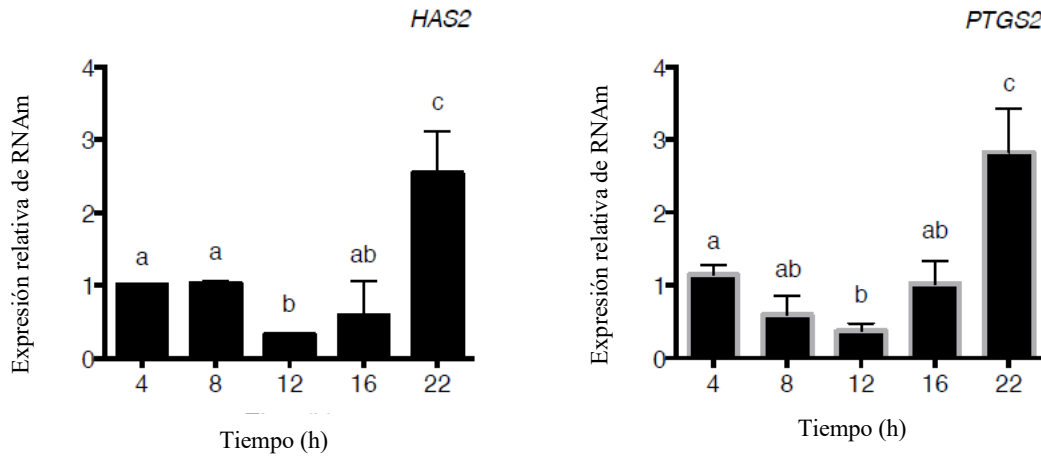
las 22 horas se apreció nuevamente un incremento (P<0.05) en su expresión (Figura 8).



**Figura 8.** Efecto de la JR en la abundancia relativa de RNAm de AREG, EREG y EGFR a las 4, 8 12, 16 y 22 de incubación. Se muestra la abundancia relativa comparada con los genes housekeeping H2FZA y YWHAZ. Las barras marcadas con “\*” indica diferencia (P<0.05).

### Marcadores de expansión.

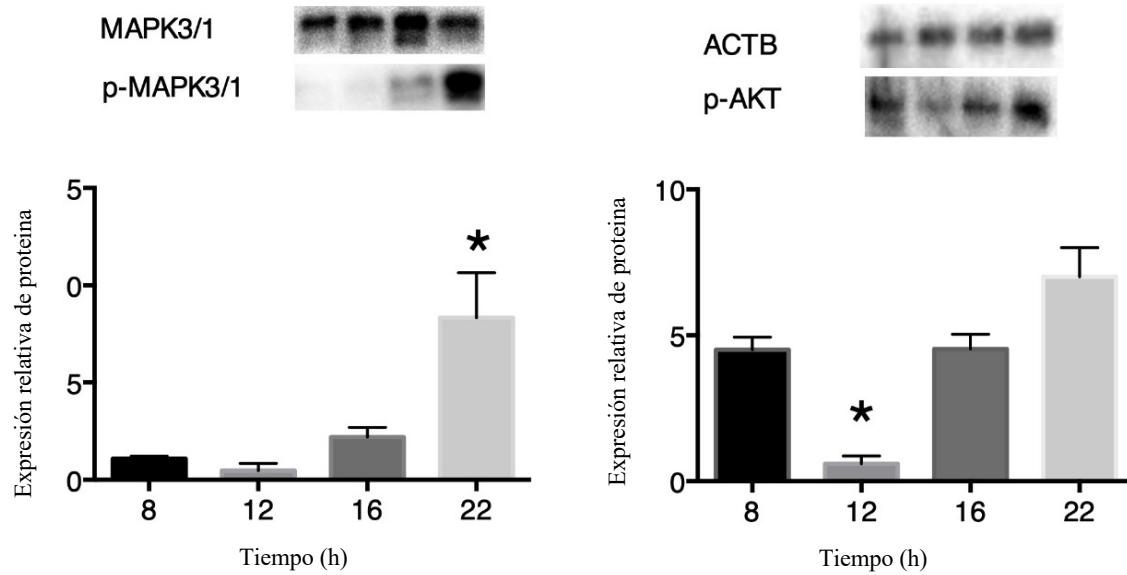
La expresión de HAS-2 y PTGS-2 (Fig.9) se caracterizó por un efecto bifásico es decir una disminución ( $p < 0.05$ ) a las 12 horas de incubación y un repunte máximo en la expresión a las 22 horas comparado con los otros tiempos ( $P < 0.05$ ).



**Figura 9.** Efecto de la JR en la expresión relativa de RNAm de PTGS-2 y HAS-2 a las 4, 8, 12, 16 y 22 hrs de cultivo. Los índices a y b indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

### Identificación de proteínas

La presencia de p-MAPK3/1 y p-AKT en extractos de proteína de COC's cultivados con JR se presenta en la figura 10. La proteína MAPK3/1 se incremento en función del tiempo, siendo la mayor ( $p < 0.05$ ) presencia a las 22 horas; en contraste, p-AKT presentó una disminución ( $p < 0.05$ ) a las 8 horas de incubación que se revertió desde las 16 horas hasta el final del estudio (22 horas).



**Figura 10.** Efecto de la JR en la presencia de las proteínas MAPK 3/1 y p-AKT. Los COC's fueron cultivados durante 8,12, 16 y 22 h. La abundancia total de la proteína p-MAPK 3/1 se expresa relativa al total de MAPK 3/1, y p-AKT fue normalizado para  $\beta$ -actina (ACTB) en todos los tiempos. El asterisco indica diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La expansión de las células del cumulus juega un papel importante durante la fertilización, ya que involucra la producción y estabilización de la matriz extracelular entre las células del cumulus y el ovocito<sup>52</sup>. Diferentes autores coinciden en que la unión de FSH a su receptor permite la transcripción de AREG y EREG y su posterior unión al receptor de EGF (EGFr) durante las primeras horas de maduración<sup>11,86</sup>.

En este estudio se revisó el efecto de 10 mg/ml de Jalea Real sobre la expansión de las células del cumulus en comparación con un grupo de COC's tratado con 20 ug/ml de FSH y un grupo control que no fue tratado ni con FSH ni con Jalea Real. La examinación de estos grupos transcurridas las 22 horas de maduración reveló que los COC's de bovino pueden expandir su cumulus al ser estimulados con 10 mg/ml de Jalea Real en ausencia de FSH. Estos resultados guardan relación con los mostrados por Amiri y colaboradores (2016)<sup>5</sup> quienes reportaron que los COC's de ovino en presencia de 10 mg/ml de JR al medio de maduración incrementa significativamente el número de ovocitos en MII, evidencia que tiene similitud con lo reportado por *Eshtiyaghi y colaboradores (2016)*<sup>6</sup>.

Si bien los parámetros de evaluación del presente estudio fueron distintos a los que se muestran en los estudio antes mencionados, nuestros resultados confirman el potencial de la Jalea Real para estimular la expansión del cumulus, aun en ausencia de compuestos hormonales. Estudios realizados anteriormente muestran que la Jalea Real es un excelente sustituto del Suero Fetal Bovino (FBS), pues contiene compuestos proteícos como las proteínas mayores de la Jalea Real, mismas que se han descrito tienen funciones reguladoras en la vía de señalización de EGFR<sup>1,4</sup>. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito cual es la vía de señalización estimulada por dichos componentes en los COC de bovino.

Con el fin de conocer la posible via de señalizacion en este estudio se analizo la expresión de genes relacionados con la expansión del cumulus en diferentes puntos de tiempo (4.8,12,16 y 22 horas), para ello se observó que la dosis utilizada de Jalea Real sobre los COC`s de bovino generó una mayor

expresión de los genes, AREG y EREG a las 8 horas de iniciado el IVM (Figura 8), resultados que coinciden con el efecto generado por la FSH en el COC's de bovino durante la IVM<sup>11,13,14</sup>.

Adicionalmente, se presentó un incremento en la expresión del EGFR a las 22 horas de IVM (Figura 8). Esta última evidencia guarda relación con el estudio de *Caixeta (2013)*, quienes reportaron que la expresión de EGFR en COC's de bovino carentes de FSH disminuye gradualmente a lo largo de la maduración, pero aumenta nuevamente a las 20 horas de maduración<sup>11</sup>. Aunque los autores no explican la razón de este fenómeno, se sabe que la expresión de los genes de expansión del cumulus está regulada por la activación de EGFR durante las últimas horas de IVM<sup>67</sup>. Como ya fue mencionado anteriormente, la JR contiene proteínas capaces de estimular la expresión de EGFR para diversos efectos, principalmente durante la metamorfosis de la abeja reina<sup>1,3</sup>. Con base en lo antes mencionado, se propone que la ausencia de FSH en medio de IVM permite que los componentes proteicos de la Jalea Real estimulen la síntesis del ARNm de este receptor a las 22 horas de IVM. Por otro lado, los resultados obtenidos en la expresión de HAS-2 y PTGS2 coinciden con los mostrados por Amiri et al 2016 quienes observaron que ambos genes se expresan en mayor abundancia cuando los COC's de ovino son cultivados con 10 mg/ml de JR<sup>5</sup>, lo que, en conclusión de dichos autores, se encuentra relacionado con el aumento del metabolismo de la glucosa a través de la vía de síntesis de hexosamina, fenómeno necesario para la síntesis de ácido hialurónico durante la expansión del cumulus<sup>52,74</sup>.

En conjunto, los resultados ya mencionados apoyan nuestra hipótesis principal, la cual se basa en que la Jalea Real activa un patrón de expresión de varios genes, incluyendo AREG/EREG, EGFR y HAS-2/PTGS2. Esto se encuentra respaldado por los resultados obtenidos en los patrones de activación de AKT y MAPK 3/1 en los COC de bovino cultivados con Jalea Real (Figura 10) para diferentes puntos de tiempo. Con base en lo mencionado, se considera que el escenario más plausible es que la Jalea Real actúa directamente sobre las células del cumulus del COC a través de la activación de MAPK 3/1. Es importante

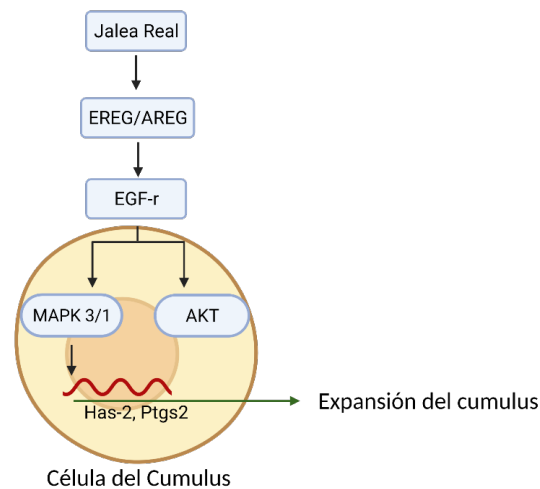
señalar que la expresión de HAS-2 y PTGS2 es regulada por MAPK 3/1, permitiendo que las células de la granulosa sintetizen y liberen ácido hialurónico en el espacio extracelular cuando se están expandiendo<sup>87,88</sup>. MAPK 3/1 es activada por la vía de señalización de EGF en las células del cumulus de bovino, y aunque no es una proteína que esté involucrada exclusivamente en este evento, está bien documentado que su activación está estrechamente relacionada con la regulación de HAS-2 y PTGS2 en las células del cumulus<sup>89</sup>. Mientras que, el incremento de la actividad de AKT después de las 12 horas implica que la Jalea Real exhorta la actividad anti-apoptótica y el metabolismo de la glucosa en el COC de bovino a través de esta vía para apoyar el proceso de maduración directamente en el ovocito.

La información que se ha generado en este estudio nos hace concluir que la Jalea Real posee un compuesto de origen proteico que puede unirse a los receptores de FSH o EGF para estimular la expansión del cumulus en el COC de bovino. Esto nos trae una pregunta fundamental: ¿Qué pasaría en la expansión de los COC's de bovino en presencia de Jalea Real y FSH? La Jalea Real contiene proteínas, como la Royalactina, que permiten la metamorfosis de la larva en abeja reina, a través de la estimulación del EGFR<sup>81</sup>. De igual forma, otros estudios han concluido que la Proteína Mayor de la Jalea Real 1 (MRJP1) puede extender la vida de *Drosophila melanogaster* y de *Ceanorhabditis elegans* al modular la vía de señalización de EGFR<sup>1</sup>. Además, en estudios realizados previamente se demostró el potencial de la Jalea Real como sustituto del Suero Fetal Bovino (FBS) pues contiene elementos como glucosa y antioxidantes que mejoran las condiciones del medio de cultivo para células de mamíferos<sup>3,10,79</sup>. Con base en esta información, se genera la hipótesis de que la presencia de FSH y Jalea Real aumentarían el porcentaje de COC's de bovino expandidos al potenciar la función de la vía de EGF-EGFR. A pesar de esto, si la Jalea Real es agonista u antagonista de la FSH, es una pregunta que queda abierta para su investigación en futuros estudios.

## CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que 10 mg/ml de JR permite la expansión de los COC de bovino en ausencia de FSH. Hasta donde se tiene conocimiento este es el primer estudio que demuestra el efecto de la jalea real sobre la expansión de los COC's de la especie bovina en un medio de maduración *in vitro* en ausencia de FSH posiblemente a través de la vía de señalización EGFR-MAPK (Figura 11).

Este estudio ha contribuido a determinar la posible vía a través de la cual los componentes de la Jalea Real se encuentran interactuando con las células del cumulus durante la IVM del COC de bovino. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar el componente específico de la Jalea Real que permite la activación de las rutas de señalización evaluadas en este estudio y también, es necesario realizar más estudios para determinar si la Jalea Real puede interactuar con otras vías de señalización relacionadas con la maduración y la expansión del cumulus en el COC de bovino, así como sus posibles efectos agonistas u antagonistas en presencia de hormonas.



**Figura 11.** La Jalea Real estimula la transcripción de AREG/EREG que, a través de la activación de EGFR, estimulan la vía de señalización de MAPK 3/1 y AKT, para estimular la transcripción de HAS-2 y PTGS-2 cuyos productos promueven la expansión de las células del cumulus en el COC de bovino.



## ANEXOS

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Situación Anatómica del Aparato Reproductor de la Vaca.....	10
Figura 2 Eje Hipotálamo-Hipófisis Gonadal.....	13
Figura 3 Ciclo Estral.....	14
Figura 4 Características Morfológicas de las Células Foliculares .....	17
Figura 5 Maduración Nuclear del Ovocito.....	22
Figura 6 Vía de Señalización de la FSH.....	23
Figura 7 Efecto de la Jalea Real en la Expansión del Cumulus.....	40
Figura 8 Efecto de la Jalea Real en la Expresión de AREG, EREG y EGFR.....	41
Figura 9 Efecto de la Jalea Real en la Expresión de HAS-2 y PTGS-2.....	42
Figura 10 Efecto de la Jalea Real en la Expresión de MAPK 3/1 y AKT.....	43
Figura 11 Vía de Señalización Estimulada por la Jalea Real.....	47

Las figuras que ilustran el presente estudio fueron elaboradas con la aplicación Biorender.com.

### LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Composición del Líquido folicular.....	20
Cuadro 2 Hormonas esteroidales sexuales en el líquido folicular.....	21
Cuadro 3 Composición del TCM 199.....	25
Cuadro 4 Hormonas esteroidales sexuales en la Jalea Real.....	29
Cuadro 5 Primers.....	37

## ABREVIACIONES

ACTB  $\beta$ -Actina

AREG Anfirregulina

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

AKT AK

AMPc Adenosin monofosfato cíclica

GMPc Guanosin monofosfato cíclico

CNP Péptido natriurético C

COC Complejo cumulus ovocito

E2 Estradiol

ECL Quimioluminiscencia mejorada

EGF-like Similar al factor de crecimiento epidermal

EGFR Receptor del factor de crecimiento epidermal

EREG Epirregulina

FBS Suero fetal bovino

FSH Hormona foliculoestimulante

GnRH Hormona liberadora de gonadotropinas

GTP Guanosin trifosfato

GVBD Ruptura de la vesícula germinal

H2AFZ Histona 2A

HAS-2 Hialuronano sintasa 2

HRP Peroxidasa del rabano picado

IVM Maduración in vitro

JR Jalea real

LH Hormona luteinizante

MAPK Proteincinasa activada por mitógenos

p-MAPK

MII Metafase II

MPF Factor promotor de la meiosis

PTGS-2 Prostaglandin-endoperóxido sintasa 2

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

TCM 199 Medio de Cultivo de Tejido 199

TTBS Solución salina buferada con TRIS + Tween 20

YWHAZ Proteína Z activadora de la Tirosin-3-Monooxigenasa/Tirosin-5-Monooxigenasa

## ANEXO

**Anexo 1. Porcentaje de expansión (%) de los COCs de bovino cultivados con JR, FSH o sin hormonas (Control) después de 22h.**

<b>Grado de Expansión</b>	<b>n</b>	<b>Control</b>	<b>Jalea Real</b>	<b>FSH</b>
<b>1</b>	40	92.5	2.5	2.5
<b>2</b>	40	5	10	7.5
<b>3</b>	40	2.5	87.5	90

## REFERENCIAS

1. Ramanathan ANKG, Nair AJ, Sugunan VS. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *J Funct Foods*. 2018 May 1;44:255–64.
2. Li X, Huang C, Xue Y. Contribution of Lipids in Honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly to health. *J Med Food*. 2013 Feb 1;16(2):96–102.
3. Moriyama T, Ito A, Omote S, Miura Y, Tsumoto H. Heat Resistant Characteristics of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) Oligomer. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 28 [cited 2022 Mar 12];10(5):e0119169. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119169>
4. Detienne G, de Haes W, Ernst UR, Schoofs L, Temmerman L. Royalactin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through epidermal growth factor signaling. *Exp Gerontol*. 2014 Dec 1;60:129–35.
5. 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.
6. Eshtiyaghi M, Deldar H, Pirsaraei ZA, Shohreh B. Royal jelly may improve the metabolism of glucose and redox state of ovine oocytes matured in vitro and embryonic development following in vitro fertilization. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(9):2210–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.019>
7. Evans JD, Wheeler DE. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 May 5 [cited 2022 Oct 25];96(10):5575. Available from: </pmc/articles/PMC21902/>
8. Veshkini A, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Ghanem N, Abazari-kia AH, Mottaghi E, Kamaledini R, et al. Oocyte maturation with royal jelly increases embryo development and reduces apoptosis in goats. *Anim Reprod* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 May 18];15(2):124. Available from: </pmc/articles/PMC8186877/>
9. Liu X, Jiang C, Chen Y, Shi F, Lai C, Shen L. Major royal jelly proteins accelerate onset of puberty and promote ovarian follicular development in immature female mice. *Food Science and Human Wellness*. 2020 Dec 1;9(4):338–45.
10. Chen D, Xin X xuan, Qian H cheng, Yu Z yin, Shen L rong. Evaluation of the major royal jelly proteins as an alternative to fetal bovine serum in culturing human cell lines. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Feb 10];17(6):476. Available from: </pmc/articles/PMC4913796/>
11. Caixeta ES, Machado MF, Ripamonte P, Price C, Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(6):890–9.
12. Shimada M. Regulation of Oocyte Meiotic Resumption by Somatic Cells. In: Krisher RL, editor. *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals*. 1st ed. Wiley-Blackwell; 2013. p. 248.
13. Khan DR, Guillemette C, Sirard MA, Richard FJ. Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Mar 18];21(9):688–701. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article/21/9/688/1018975>

14. Sirard MA. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(1):54–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.018>
15. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil*. 1996;106(1):7–16.
16. Ni H, Sheng X, Cui X, Gu M, Liu Y, Qi X, et al. Epidermal growth factor-mediated mitogen-activated protein Kinase3/1 pathway is conducive to in vitro maturation of sheep oocytes. *PLoS One*. 2015;10(3):1–12.
17. Nuttinck F, Gall L, Ruffini S, Laffont L, Clement L, Reinaud P, et al. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: Late effects on early embryonic development. *Biol Reprod*. 2011;84(6):1248–57.
18. Roelen BAJ. Bovine oocyte maturation: Acquisition of developmental competence. *Reprod Fertil Dev*. 2019;32(2):98–103.
19. Chouzouris TM, Dovolou E, Krania F, Pappas IS, Dafopoulos K, Messinis IE, et al. Effects of ghrelin on activation of Akt1 and ERK1/2 pathways during in vitro maturation of bovine oocytes. *Zygote*. 2017;25(2):183–9.
20. Arat S, Caputcu AT, Cevik M, Akkoc T, Cetinkaya G, Bagis H. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of cloned bovine embryos. *Zygote*. 2016;24(4):554–62.
21. Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, et al. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*. 2013;146(1):27–35.
22. Dee Fails A, Magee C. Anatomy of the female reproductive system. In: Dee Fails A, Magee C, editors. *Anatomy and physiology of farm animals*. 8th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2018. p. 465–74.
23. Saherra A. Aparato reproductor de la vaca. In: Hernández Cerón J, Zavala Rayas J, editors. *Reproducción bovina*. 1st ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007. p. 21–32.
24. Mansour M, Wilhite R, Rowe J. The pelvis and reproductive organs. In: Mansour M, Wilhite R, Rowe J, editors. *Guide to ruminant anatomy: dissection and clinical aspects*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2018. p. 139–70.
25. Nabors B, Linford R. Anatomy of the reproductive system of the cow. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2015. p. 191–4.
26. Davidson AP, Stabenfeldt GH. Control del desarrollo de las gónadas y los gametos. In: Klein BG, editor. *Cunningham Fisiología Veterinaria*. 5th ed. Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2014. p. 408–15.
27. Dee Fails A, Magee C. The ovary and estrous cycle. In: Dee Fails A, Magee C, editors. *Anatomy and physiology of farm animals*. 8th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2018. p. 475–88.
28. Zarco L. Endocrinología de la reproducción. In: Rangel L, Hernández JH, editors. *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. 1st ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018. p. 79–92.

29. Hernández C J. Ciclo estral. In: Hernández C J, editor. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. 1st ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016. p. 17–32.
30. Amstalden M, Williams GL. Neuroendocrine control of estrus and ovulation. In: Hopper RM, editor. Bovine Reproduction. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2015. p. 203–18.
31. Furukawa E, Masaki T, Sakaguchi K, Bo M, Yanagawa Y, Ueda K. Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *J Ovarian Res* [Internet]. 2020;13(7):1–9. Available from: <https://ovarianresearch-biomedcentral-com.pbidi.unam.mx:2443/articles/10.1186/s13048-020-0610-5>
32. Brewster JE, Cole CL. The Time of Ovulation in Cattle\*. *J Dairy Sci.* 1940;24(2):111–5.
33. Weller MMDCA, Fortes MRS, Porto-Neto LR, Kelly M, Venus B, Kidd L, et al. Candidate gene expression in *Bos indicus* ovarian tissues: Prepubertal and postpubertal heifers in diestrus. *Front Vet Sci.* 2016;3(OCT):1–9.
34. Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology.* 2009 Jun 1;71(9):1343–57.
35. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction.* 2010;139(2):309–18.
36. Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *Journal of Reproduction and Development.* 2016;62(4):323–9.
37. Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *The Annual Review of Physiology* [Internet]. 2017;79:237–60. Available from: [https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-physiol-022516-034102?casa\\_token=ROn-Wb4NI78AAAAA:l3cILPZKAC8l05vzfqqhGAE\\_THudHO87SjCYJ4T-G27nWJ5NvRR9diQ5y6R9UDUb5ExPZBTnf6TFmg](https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-physiol-022516-034102?casa_token=ROn-Wb4NI78AAAAA:l3cILPZKAC8l05vzfqqhGAE_THudHO87SjCYJ4T-G27nWJ5NvRR9diQ5y6R9UDUb5ExPZBTnf6TFmg)
38. Russell DL, Gilchrist RB, Brown HM, Thompson JG. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(1):62–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.019>
39. Han P, Guerrero-Netro H, Estienne A, Price CA. Effects of fibroblast growth factors and the transcription factor, early growth response 1, on bovine theca cells. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018;476(May):96–102. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.013>
40. Hattori K, Orisaka M, Fukuda S, Tajima K, Yamazaki Y, Mizutani T, et al. Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle. *Endocrinology* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Apr 17];159(6):2337–47. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/159/6/2337/4969514>
41. Nogueira MFG, Fernandes P, Ereno RL, Simões RAL, Junior JB, Barros CM. Luteinizing Hormone Receptor ( LHR ): basic concepts in cattle and other mammals

- . A review. *Anim Reprod* [Internet]. 2010;7(2):51–64. Available from: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6065f7783717068b4732>
42. Teh APP, Izzati UZ, Mori K, Fuke N, Hirai T, Kitahara G, et al. Histological and immunohistochemical evaluation of granulosa cells during different stages of folliculogenesis in bovine ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018;53(3):569–81.
  43. Mamede G, del Collado M, Vieira F, Coelho J, Perecin F. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Anim Reprod*. 2019;16(3):485–96.
  44. Adams GP, Singh J. Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. In: Hopper RM, editor. *Bovine Reproduction*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2015. p. 219–44.
  45. Wrenzycki C, Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(SUPPL.1):38–43.
  46. Guerreiro TM, Gonçalves RF, Melo CFOR, de Oliveira DN, Lima E de O, Visintin JA, et al. A metabolomic overview of follicular fluid in cows. *Front Vet Sci*. 2018;5(FEB):1–9.
  47. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*. 2002;124(5):675–81.
  48. Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* [Internet]. 2007;64(February):179–90. Available from: <https://europepmc.org/article/med/17491147>
  49. Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*. 2005;129(2):219–28.
  50. Hudson NL, Berg MC, Green MP, Back PJ, Thorstensen EB, Peterson AJ, et al. The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: Effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes invitro. *Theriogenology*. 2014;82(4):563–73.
  51. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2018 Jan 1;24(1):1–14.
  52. Richani D, Sutton-McDowall ML, Frank LA, Gilchrist RB, Thompson JG. Effect of epidermal growth factor-like peptides on the metabolism of in vitro-matured mouse oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 May 5];90(3):49–50. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/90/3/49, 1-10/2514092>
  53. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *Journal of Endocrinology*. 2016;228(2):R31–43.
  54. Sinclair KD, Lunn LA, Kwong WY, Wonnacott K, Linforth RST, Craigon J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reprod Biomed Online*. 2008 Jan 1;16(6):859–68.
  55. Tabatabaei S, Mamoei M, Aghaei A. Dynamics of ovarian follicular fluid in cattle. *Comp Clin Path* [Internet]. 2011 Dec 8 [cited 2022 Mar 27];20(6):591–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-010-1038-x>



56. Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: Effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(6):499–513.
57. 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* [Internet]. 2013;80(5):470–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.009>
58. Salhab M, Dhorne-Pollet S, Auclair S, Guyader-Joly C, Brisard D, Dalbies-Tran R, et al. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Mol Reprod Dev*. 2013;80(2):166–82.
59. Ramos Leal G, Santos Monteiro CA, Souza-Fabjan JMG, de Paula Vasconcelos CO, Garcia Nogueira LA, Reis Ferreira AM, et al. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2018;199(October):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.002>
60. Pan B, Li J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17(1):1–12.
61. Landim-Alvarenga FC, Maziero RRD. Control of oocyte maturation. *Anim Reprod*. 2014;11(3):150–8.
62. Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. <http://dx.doi.org/101146/annurev-animal-022114-110822> [Internet]. 2016 Feb 16 [cited 2022 Mar 26];4:255–68. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
63. Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, et al. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* [Internet]. 2015;84(3):390–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.031>
64. Liu H, Zhou D, Liu C, Zhuan Q, Luo Y, Mo X, et al. The Calcium-Sensing Receptor Is Involved in Follicle-Stimulating Hormone-Induced Cumulus Expansion in in vitro Cultured Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 May 20 [cited 2022 Mar 19];9. Available from: [/pmc/articles/PMC8173154/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34173154/)
65. Uhde K, van Tol HTA, Stout TAE, Roelen BAJ. Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation in vitro. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):1–14.
66. Abreu FM, Coutinho da Silva MA, Cruppe LH, Mussard ML, Bridges GA, Harstine BR, et al. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: I. Characteristics of LH secretion and oocyte quality. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2018;196(March):59–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.020>
67. Palmerini MG, Nottola SA, Tunjung WAS, Kadowaki A, Bianchi S, Cecconi S, et al. EGF-FSH supplementation reduces apoptosis of pig granulosa cells in co-culture with cumulus-oocyte complexes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Dec 2;481(1–2):159–64.

68. Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2022 Mar 27];73(10):1255–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.20553>
69. 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* [Internet]. 2014;81(9):1149–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.001>
70. Matsuo M, Sumitomo K, Ogino C, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M. Three-step in vitro maturation culture of bovine oocytes imitating temporal changes of estradiol-17 $\beta$  and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid. *Arch Anim Breed*. 2017;60(4):385–90.
71. de Vos M, Smitz J, Thompson JG, Gilchrist RB. The definition of IVM is clear—variations need defining. *Human Reproduction* [Internet]. 2016 Nov 21 [cited 2022 May 5];31(11):2411–5. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/31/11/2411/2274315>
72. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of Sodium Pyruvate in Nonserum Maturation Medium on Maturation, Fertilization, and Subsequent Development of Bovine Oocytes With or Without Cumulus Cells. *Biol Reprod* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];63(6):1730–4. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/63/6/1730/2723353>
73. Funahashi H, Koike T, Sakai R. Effect of glucose and pyruvate on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 2008 Oct 15;70(7):1041–7.
74. Xie HL, Wang YB, Jiao GZ, Kong DL, Li Q, Li H, et al. Effects of glucose metabolism during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 9 [cited 2022 May 5];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4746733/](https://pmc/articles/PMC4746733/)
75. Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009;71(8):1193–208.
76. Tavares L, Feitosa W, Mello M, Nicacio A, Lima A, Assumpcao M, et al. Is the early reduction of fetal calf serum concentration in bovine in vitro embryo culture beneficial? *Anim Reprod* [Internet]. 2008;5(1/2):34–8. Available from: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6075f7783717068b478d>
77. Ruiz Gálvez KV. Comparación del uso de Jalea Real de Apis Mellifera como reemplazo del Suero Fetal Bovino durante la Maduración In Vitro de Ovocitos de Ovino Colectados durante época reproductiva y anestro estacional [Internet]. [Ciudad de México]; 2021 [cited 2022 Mar 18]. Available from: <http://132.248.9.195/ptd2021/junio/0813259/Index.html>
78. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1):99–118.
79. Ahmad S, Campos MG, Fratini F, Altaye SZ, Li J. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):1–26.
80. Li J, Su S, Jianke LI, Aiping W. Optimizing royal jelly production Transcriptomic Analysis of Honeybee View project Honey bee chalkbrood-resistance breeding

- programm View project [Internet]. 2003. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/294539753>
81. Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*. 2011 May 26;473(7348):478–83.
  82. Lin XM, Liu S bin, Luo YH, Xu WT, Zhang Y, Zhang T, et al. 10-HDA Induces ROS-Mediated Apoptosis in A549 Human Lung Cancer Cells by Regulating the MAPK, STAT3, NF- $\kappa$ B, and TGF- $\beta$ 1 Signaling Pathways. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
  83. Castro-Chávez N. Evaluación de la eficiencia reproductiva de cabras (*Capra hircus*) tratadas con esponjas intravaginales impregnadas con jalea real de abeja (*Apis mellifera*) vs cabras tratadas con Controlled Internal Drug Release CIDR. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.
  84. Kamakura M, Suenobu N, Fukushima M. Fifty-seven-kDa Protein in Royal Jelly Enhances Proliferation of Primary Cultured Rat Hepatocytes and Increases Albumin Production in the Absence of Serum. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Apr 13;282(4):865–74.
  85. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 May 5 [cited 2023 Jan 8];29(9):e45. Available from: [/pmc/articles/PMC55695/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11836462/)
  86. Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2022 Mar 15];20(6):499–513. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article/20/6/499/1073185>
  87. Pepling M, Uslu B, Johnson J, Shimada M, Thompson JG, Mottershead DG, et al. *Oocyte Physiology and Development*. 1st ed. Krisher RL, editor. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013. 231 p.
  88. Rodrigues SAD, Pontelo TP, Kussano NR, Kawamoto TS, Leme LO, Caixeta FMC, et al. Effects of Prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Domest Anim Endocrinol*. 2020;72:106447.
  89. Schuermann Y, Rovani MT, Gasperin B, Ferreira R, Ferst J, Madogwe E, et al. ERK1/2-dependent gene expression in the bovine ovulating follicle. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–16.
  90. Silva CMG, Castro S v., Faustino LR, Rodrigues GQ, Brito IR, Rossetto R, et al. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. *Res Vet Sci*. 2013 Jun 1;94(3):453–61.
  91. Ríos GL, Buschiazzo J, Mucci NC, Kaiser GG, Cesari A, Alberio RH. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of invitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. *Theriogenology* [Internet]. 2015;83(5):874–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.022>
  92. Andrade GM, da Silveira JC, Perrini C, del Collado M, Gebremedhn S, Tesfaye D, et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. *PLoS One*. 2017;12(9):1–15.

93. Ali FEM, Saad Eldien HM, Mostafa NAM, Almaeen AH, Marzouk MRA, Eid KM, et al. The Impact of Royal Jelly against Hepatic Ischemia/Reperfusion-Induced Hepatocyte Damage in Rats: The Role of Cytoglobin, Nrf-2/HO-1/COX-4, and P38-MAPK/NF- $\kappa$ B-p65/TNF- $\alpha$  Signaling Pathways. *Curr Mol Pharmacol*. 2020 May 15;14(1):88–100.
94. Chi X, Liu Z, Wei W, Hu X, Wang Y, Wang H, et al. Selenium-rich royal jelly inhibits hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT and VEGF pathways in H22 tumor-bearing mice. *Food Funct* [Internet]. 2021 Oct 4 [cited 2022 Oct 25];12(19):9111–27. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/fo/d1fo01070k>
95. Xiyi Hu, Zhenguo Liu, Yuntao Lu, Xuepeng Chi, Kai Han, Hongfang Wang, et al. Glucose metabolism enhancement by 10-hydroxy-2-decenoic acid via the PI3K/AKT signaling pathway in high-fat-diet/streptozotocin induced type 2 diabetic mice. *Food Funct* [Internet]. 2022 Oct 3 [cited 2022 Oct 25];13(19):9931–46. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/fo/d1fo03818d>