

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**APLICACIÓN DE JALEA REAL EN EL MEDIO DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE
OVOCITOS DE BOVINO PARA SU POSTERIOR FERTILIZACIÓN *IN VITRO*.**

Prestador de servicio social:

Lucio Santos Ventura

Matricula: 2113075659

Asesores:

Interno: Dr. Filiberto Fernández Reyes

Núm. Económico: 17066

Dra. Esmeralda Mónica Peña González

Núm. Económico: 41632

Lugar de realización:

Laboratorio de Manejo de la Reproducción, UAM Xochimilco, ubicado en Calz. Del Hueso No. 1100, Edificio F, 2do Piso, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, CDMX, CP 04960

Fecha de inicio: 2 de julio del 2018

Fecha de término: 2 de enero del 2019

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el desarrollo de ovocitos recuperados de ovarios de matadero adicionando jalea real al medio TCM-199, para maduración *in vitro*. Se realizaron 11 experimentos en los cuales se tuvo un total de 339 ovocitos, estos fueron distribuidos al azar en dos grupos; 1) grupo control y 2) grupo suplementado con 10 mg/ml de jalea real al medio de maduración. En la fertilización se utilizó semen congelado a una concentración 1×10^6 , en medio TBM suplementado 20 μ l heparina y 40 μ l de PHE. Para el desarrollo embrionario se usó el medio SOF-1 el primer día y SOF-2 a partir del segundo día. El resultado obtenido de maduración determinado con el desarrollo embrionario en el grupo control fue menor comparado con el grupo tratado con jalea real 29.7% y 41.5% respectivamente ($P < 0.05$). La maduración obtenida con tinción DAPI fue inferior en el grupo control 59.0% en contraste con el grupo suplementado 73.3% ($P < 0.05$). La viabilidad también fue menor en el grupo control comparado con el tratado 38.7% y 57.5% respectivamente ($P < 0.05$). El desarrollo embrionario de los ovocitos fertilizados en el grupo control fue de 30.0% y en el grupo suplementado con jalea real alcanzo un 50.5% ($P < 0.05$), la etapa final de desarrollo evaluada en el presente estudio fue el estadio de mórula, observando 4.2% para el grupo control y 6.4% para el grupo tratado ($P < 0.05$). Se concluye que el uso de jalea real en el medio de maduración *in vitro* en ovocitos de bovino mejora favorablemente la maduración, la viabilidad y el desarrollo embrionario.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una herramienta biotecnológica de uso comercial que permite aumentar la eficiencia reproductiva en las hembras. Los reportes indican que el uso de la PIVE ha venido creciendo de manera considerable en los últimos años, según la International Embryo Technology Society (IETS) en su informe anual de datos recogidos a nivel mundial, durante el año 2015 hubo un incremento alrededor del 500%, evidenciando una mayor demanda de esta biotecnología (Velez, *et al.*, 2017).

La maduración de ovocitos *in vitro* depende de la disponibilidad de sustratos metabólicos apropiados, como proteínas, glucosa, piruvato, oxígeno, aminoácidos, hormonas y vitaminas en los medios de cultivo, que afectan la reanudación de la meiosis en el ovocito. Para lograr esto, el complejo cumulus-ovocito debe recibir los nutrientes de su entorno en niveles favorables. Por otro lado, la regulación del metabolismo de los nutrientes es uno de los factores clave que influyen en la calidad embrionaria (Álvarez, 2010).

A pesar de la gran acogida de esta técnica y a la optimización que se tiene hoy en día de la PIVE, solo alrededor del 20-30 % de los ovocitos recuperados de hembras bovinas pueden llegar a convertirse en embriones transferibles, lo que podría deberse en parte a la utilización de ovocitos con una baja competencia de desarrollo. Se ha descrito que la calidad de los ovocitos se ve afectada principalmente por sus propiedades intrínsecas, como la capacidad de almacenamiento de biomoléculas que permitan su desarrollo posterior (Vélez, *et al.*, 2017).

Dentro de la célula la cadena transportadora de electrones en la respiración mitocondrial, produce una reducción parcial de oxígeno y además de originar agua (H₂O) como producto final, se generan radicales libres y especies reactivas de oxígeno. La fuente biológica fundamental de estos radicales libres, es la mitocondria, como consecuencia directa del proceso de respiración celular; alrededor del 5 % del oxígeno que se consume sigue la vía univalente originando metabolitos intermediarios parcialmente reducidos o con diferente grado de oxidación, los

cuales constituyen radicales libres, por tanto, el metabolismo normal que ocurre en la célula es fuente de estas especies nocivas. Un exceso de radicales libres rompe el equilibrio celular dando lugar al inicio de una serie de reacciones químicas que pueden conducir a la aparición de graves desórdenes fisiológicos y la muerte de la misma (León, *et al.* 2018)

Según un estudio realizado por Zahmatkesh, *et al.*, (2015) la jalea real aumenta la actividad de la catalasa y la capacidad antioxidante total, los antioxidantes, incluyendo las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa que se producen constantemente durante los procesos metabólicos y fisiológicos normales, contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados. Con el uso de la jalea real obtuvieron un aumento en la tasa de fertilización y el porcentaje de blastocistos, lo que probablemente se deba a su efecto sobre la capacidad antioxidante. Por esta razón el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la jalea real en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de bovino.

MARCO TEÓRICO

La jalea real es una emulsión de proteínas, azúcares y lípidos en agua, contiene alrededor de 1,5% de sales minerales (principalmente cobre, zinc, hierro, calcio, manganeso, potasio y sales de sodio), pequeñas cantidades de flavonoides, polifenoles y vitaminas (biotina, ácido fólico, inositol, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina y vitamina E), se pueden distinguir los flavonoides: flavanonas (hesperetina, isosakuranetin y naringenina), flavonas (acacetina, apigenina y su glucósido, crisina y glucósido de luteolina), flavonoles (isorhamnetin y glucósidos de kaempferol) e isoflavonoides (coumestrol, formononetina, y genisteína) (Kcot, *et al.*, 2018).

Las propiedades antioxidantes de la jalea real sobre estrés oxidativo se atribuyen a la presencia de sustancias como el ácido 10-hidroxi-2-decenoico y aminoácidos libres, se ha reportado que la prolina actúa como antioxidante debido a la actividad de eliminación de radicales hidroxilo, así como la cistina y cisteína que participan en la síntesis de antioxidantes celulares (Kcot, *et al.* 2018).

Las hipótesis postuladas que explican el efecto antioxidante de la jalea real son la restauración de la disponibilidad de ácido ascórbico por jalea real, la regulación de la pérdida de retinol, el efecto antioxidante de algunos aminoácidos libres, o las actividades de que secuestran radicales y sus componentes (Kcot, *et al.* 2018).

Los tocoferoles protegen la integridad de las membranas celulares y pueden neutralizar al O_2^- . El ácido ascórbico (vitamina C) tiene un efecto similar al de la catalasa, desdoblado el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (León, *et al.* 2018).

La alta inestabilidad atómica de los radicales libres provoca su colisión con otras biomoléculas a las cuales le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. En las primeras se altera la permeabilidad

conduciendo al desbalance homeostático y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Esta oxidación lipídica consta de reacciones en cadena que al oxidar un ácido graso lo convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar otra molécula vecina. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, genera numerosos subproductos (León, *et al.* 2018).

El efecto antioxidante de la jalea real no solo podría asociarse con el efecto de eliminación de radicales sino también con otro efecto indirecto basado en la inhibición de enzimas que catalizan la peroxidación de lípidos endógenos y la expresión génica del citocromo P450, que es una de las fuentes intracelulares de H_2O_2 , O_2 y HO radicales (Kcot, *et al.* 2018).

La membrana plasmática del ovocito tiene una actividad dinámica que cumple un papel importante en los procesos de maduración, sin embargo, el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañarla y una de las principales causas del deterioro es el estrés oxidante que causa peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, modifica su fluidez y altera la permeabilidad, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular. La manipulación de ovocitos *in vitro* con exceso de O_2 sufren una peroxidación lipídica que les causa daño en la membrana y subsecuentemente su integridad (Membrillo, *et al.* 2003).

De acuerdo a un estudio realizado por Eshtiyaghi, *et al.*, (2016), en donde utilizaron diferentes concentraciones de jalea real en medios de cultivo, observaron que una concentración de 10 mg/mL de jalea real en el medio de maduración mejora la tasa de fertilidad y la formación de blastocistos, lo cual pueden deberse a una mayor actividad de la glicolisis y la vía de la pentosa fosfato en las células del cumulus y la actividad de enzimas antioxidantes tanto en las células de ovocitos como en las de los cumulus.

OBJETIVOS

General:

- Adicionar jalea real al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de bovino para aumentar el porcentaje de maduración *in vitro*.

Particulares:

- Encontrar la cantidad óptima de jalea real para agregar a los medios de maduración *in vitro*.
- Evaluar si hay mejoras en viabilidad de los ovocitos después de ser madurados *in vitro* con jalea real en el medio.
- Determinar el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro* después de la maduración *in vitro* con jalea real en el medio.

MÉTODOS

Este experimento fue realizado con la metodología expuesta en el trabajo de Peláez (2011) que consta de los siguientes puntos para la obtención y maduración de ovocitos de bovino.

1. Acondicionamiento de ovario.
 - a) Una vez en el laboratorio, los ovarios serán acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos.
 - b) Lavar los ovarios tres veces en solución fisiológica estéril.
2. Punción de ovarios.
 - a) Posteriormente se procederá a la punción de los folículos de 2-10 mm de diámetro, utilizando agujas de 21g para aspirar su contenido, a 50 mmhg de presión negativa.
3. Evaluación de ovocitos
 - a) Los ovocitos obtenidos fueron posteriormente seleccionados bajo lupa estereoscópica (x20), conservando aquellos que presenten varias capas

compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo o con pequeñas granulaciones (grado 1-2).

4. Lavado y selección de los ovocitos.

- a) El fluido de los ovarios fue colocado sobre una placa de búsqueda.
- b) Se seleccionaron los ovocitos y se los lava al menos tres veces mediante el pasaje a través gotas del medio de maduración sobre cajas de Petri.
- c) Una vez lavados y seleccionados, fueron posteriormente colocados los ovocitos al azar en dos grupos, control y el suplementado con jalea real en un pozo, en cajas cuadradas de 4 pozos, conteniendo medio de maduración.

5. Maduración de ovocitos.

- a) Placas de cultivo. Compuestas de 4 pozos conteniendo con medio de maduración comercial (TCM-199 In Vitro S.A. México).
- b) Se pusieron a incubar en estufa a 38,5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 20-24hs.

6. Fertilización de ovocitos maduros *in vitro*.

- a) Pasadas las 20-24 hrs de iniciada la maduración se procedió a la fertilización de los ovocitos, utilizándose para este procedimiento semen congelado-descongelado.
- b) Para la fertilización se colocaron nuevas placas de cultivo con medio de fertilización. Por cada gota se colocaron 400µl de medio de fertilización (TBM) más 20µl de una solución de heparina y 40µl de un combinado de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) diluida en medio de fertilización.
- c) Al colocar en cada gota de cultivo la cantidad de semen correspondiente (100 µl) se llevaron a la incubadora durante 24hrs. La dosis espermática es generalmente de 1×10^6 espermatozoides por ml de medio.
- d) Después de las 24 hrs se lavan en 4 gotas de 100 µl en medio SOF-1 In Vitro S.A. México y se cultivan en 500 µl del mismo medio.
- e) Pasadas las 48 horas los cigotos fueron evaluados, para determinar el número de ovocitos fecundados exitosamente.

- f) A partir de las 48 hrs y en los días posteriores se suplemento el medio con 250 μ l de SOF-2 In Vitro S.A. México

Para la preparación del extracto acuoso de jalea real se siguió la metodología de Eshtiyaghi, *et al.* (2016).

- Se disolvieron 1000 mg de jalea real mezclado en 10 ml de agua desionizada. La mezcla se agitó durante el tiempo suficiente para obtener una mezcla homogénea. El extracto se filtra usando un filtro de 0,22 mm, manteniéndose a 4^o en refrigeración.

El análisis estadístico se realizó con los datos del porcentaje de cada experimento en JMP de SAS 8.0, presentando los datos como media en la tabla de maduración, los intervalos de confianza con una significancia del (0.05). Para observar la diferencia mínima significativa se utilizó la prueba de Tukey, usando el programa SPSS (IBM SPSS Statistics 22, 2013).

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

- La cantidad óptima se determinó en base a los estudios realizados por Eshtiyaghi, *et al.* (2016).
- Se logró un aumento en la maduración al adicionar jalea real al medio de maduración *in vitro*.
- Se logró un mayor número de ovocitos fertilizados, así como una mayor maduración en el grupo tratado con jalea real en el medio de cultivo.

RESULTADOS

En el presente estudio se realizaron 11 experimentos y se obtuvo un total de 339 ovocitos, los cuales fueron distribuidos al azar en dos grupos, el grupo 1) control con 168 ovocitos y 2) suplementado con 10 mg/ml de jalea real en el medio de

maduración con 171 ovocitos. En 163 ovocitos la maduración fue evaluada mediante la tinción de DAPI, la viabilidad fue determinada en 64 ovocitos con la tinción de MTT y fueron cultivados 121 ovocitos fertilizados para desarrollo embrionario. Por diversas circunstancias, un total de 55 ovocitos no fueron evaluados, que corresponden al grupo control 48 y del grupo tratado 7.

Tabla 1. TOTAL DE OVOCITOS EVALUADOS EN MADURACIÓN, VIABILIDAD Y DESARROLLO EMBRIONARIO.

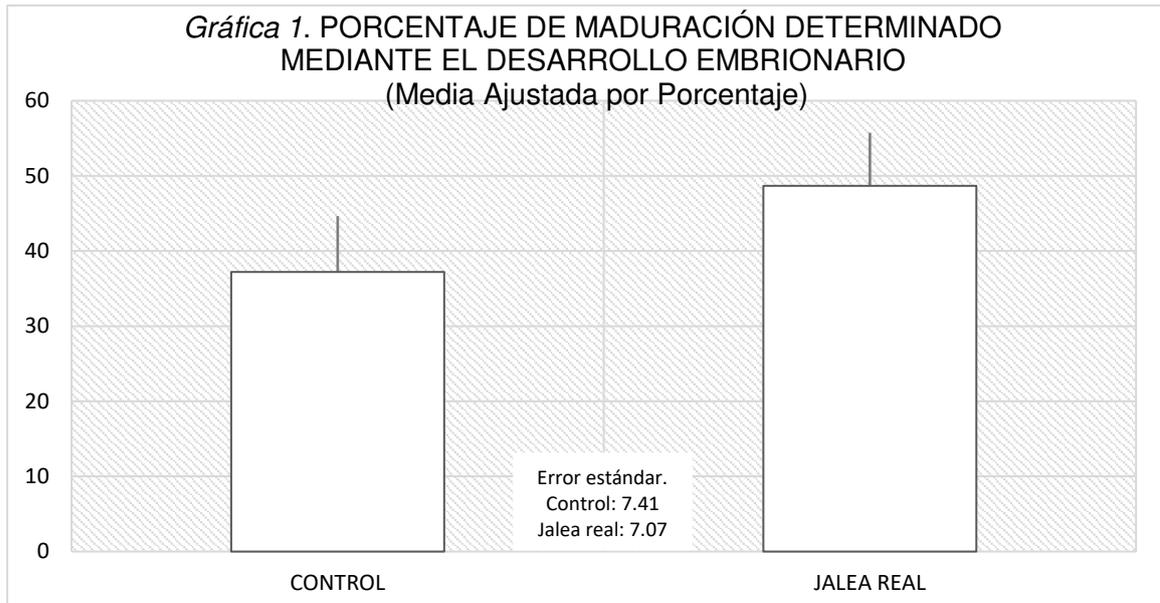
Tratamiento	Experimentos	Total ovocitos	DAPI	MTT*	Desarrollo embrionario
Control	11	168	70	31	50
Jalea Real	11	171	93	33	71
Total	22	339	163	64*	121

*A los ovocitos evaluados con MTT se aplicó doble tinción para observar tanto maduración como viabilidad.

Tabla 2. MADURACIÓN POR DESARROLLO EMBRIONARIO.

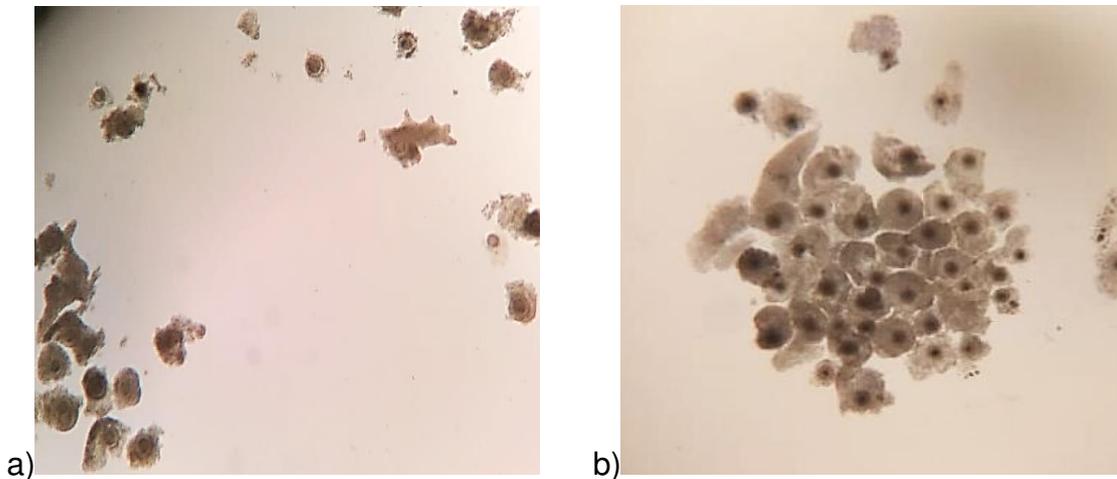
Tratamiento	Experimentos	Total Ovocitos	Madurados
Control	11	168	50 (29.7%) ^a
Jalea Real	11	171	71 (41.5%) ^b

En la tabla podemos observar una diferencia significativa ($P < 0.05$) en los ovocitos madurados.



En esta grafica se puede observar la diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de maduración entre el grupo control con 37.2% y el grupo suplementado con jalea real con un 48.6%.

Ilustración 1. EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS



La expansión de las células del cumulus es mayor en los ovocitos suplementados con jalea real. a) Ovocitos del grupo control y b) Ovocitos del grupo suplementado.

Tabla 3 NÚMERO DE OVOCITOS QUE MADURARON *IN VITRO*, EVALUADOS CON DAPI

Tratamiento	Ovocitos	VG	MI	MII
Control	70	10 (14.0%)	19 (27.1%)	41 (59.0%) ^a
Jalea Real	93	10 (10.7%)	13 (13.9%)	70 (75.3%) ^b
Total	163	20 (12.2%)	32 (19.6%)	111 (68.0%)

Es evidente que hay un mayor porcentaje ($P < 0.05$) de MII en el grupo suplementado con jalea real. Vesícula Germinal (VG), Metafase I (MI), Metafase II (MII).

Ilustración 2. OVOCITO EN METAFASE II CON TINCIÓN DAPI

40X

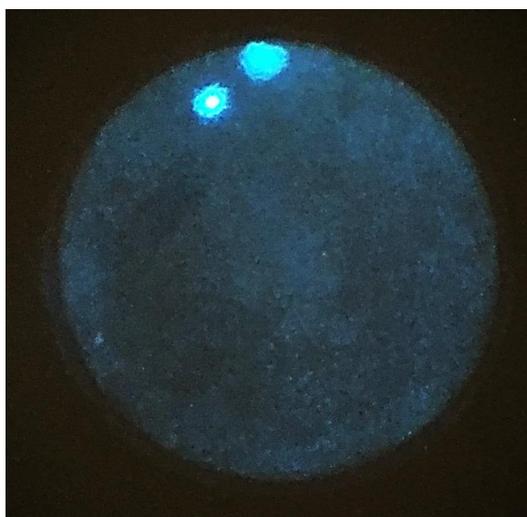


Tabla 4. VIABILIDAD DESPUÉS DE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS *IN VITRO*

Tratamiento	No viables	Viables
Control	19 (61.3%)	12 (38.7%) ^a
Jalea Real	14 (42.5%)	19 (57.5%) ^b

Después de la maduración, la viabilidad es mayor ($P < 0.05$) en el grupo suplementado con jalea real.

Tabla 5. DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS FERTILIZADOS, EVALUADOS CON DAPI

Tratamiento	2B	4B	8B	MÓRULAS	Total
Control	10 (14.0%)	8 (11.4%)	-	3 (4.3%)	21 (30.0%) ^a
Jalea Real	20 (21.5%)	15 (16.1%)	6 (6.4%)	6 (6.4%)	47 (50.5%) ^b

En el desarrollo alcanzado se observa una diferencia ($P < 0.05$) a favor del grupo suplementado con jalea real. 2 blastómeros (2B), 4 blastómeros (4B), 8 blastómeros (8B).

Ilustración 3. EMBRIÓN DE DOS BLASTÓMEROS CON TINCIÓN DAPI.

40X



Ilustración 4. EMBRIÓN EN ETAPA DE MÓRULA (16 BLASTÓMEROS).

40X

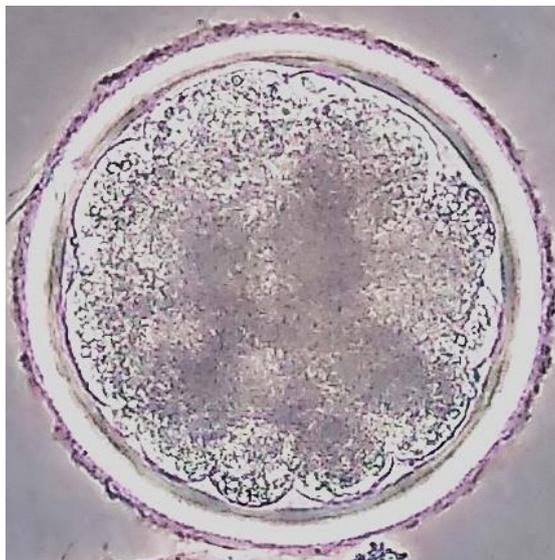


TABLA 6. MADURACIÓN TOTAL DE OVOCITOS MEDIANTE LOS DOS PROCEDIMIENTOS

Tratamiento	Total de ovocitos evaluados	DAPI	DESARROLLO EMBRIONARIO	MADURACIÓN TOTAL
Control	120	41 (34.1%)	50 (41.6%)	91 (75.8%) ^a
Jalea Real	164	70 (42.7%)	71 (43.3%)	141 (85.9%) ^b
Total	284	111 (39.1%)	121 (42.6%)	232 (81.6%)

Es evidente una mayor maduración en el grupo suplementado con jalea real ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

El efecto beneficioso del suplemento jalea real durante la maduración *in vitro* puede atribuirse a la presencia de componentes como hormonas, catecolaminas, vitaminas (ácido ascórbico y alfa-tocoferol), ácidos grasos libres, aminoácidos, proteínas y factores de crecimiento, que han demostrado ser eficaces en la reanudación de la meiosis ovocitaria y la maduración citoplásmica (Eshtiyaghi, *et al.* 2016).

En el estudio realizado por Eshtiyaghi, *et al.*, (2016) observaron cuando se añadió la Jalea Real al medio de maduración a una concentración de 10 mg/ml, una mejoría en la formación de blastocitos y disminuyó la incidencia de apoptosis en ovocitos ovinos. Ellos reportan que el 57% de los ovocitos maduro del grupo control comparada con el 93% de maduración en el grupo suplementado con jalea real, siendo este último mayor al obtenido en el presente estudio.

Por otra parte Abd-Allah S. (2012) observó que la expansión de las células del cumulus posterior a las 24-28 hrs de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja suplementados con 0.4 y 0.5% era considerablemente mejor comparando con el grupo control, además la maduración de los dos grupos suplementados con jalea real lograron el 95% a diferencia del grupo control que tuvo el 60%.

Estudios previos han confirmado que la presencia de las células del cumulus alrededor del ovocito durante la maduración *in vitro*, es esencial para el desarrollo del mismo, sugiriendo que las células del cumulus segregan factores solubles que mejoran el desarrollo de competencia del ovocito o remueven los factores que pueden inhibir o suprimir su futuro desarrollo (Fernández A., 2017). Una de las características observables en los ovocitos suplementados con jalea real es una mayor expansión de las células del cumulus como se muestra en la ilustración B.

Se ha determinado que la presencia de jalea real ayuda a provocar la vía de las pentosas fosfato, por este medio se produce NADPH, una forma reducida de la coenzima fosfato del dinucleótido de nicotinamida-adenina actúa como transportador de hidrógeno y de electrones, por su capacidad para sufrir oxidación y reducción de manera reversible, que es necesaria para los mecanismos de defensa enzimáticos. Los ovocitos neutralizan las especies reactivas de oxígeno con una variedad de sistemas de defensa antioxidantes, como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa, se conocen como mecanismo de defensa antioxidante enzimático, por otra parte la jalea real también contiene vitamina E (tocoferol), vitamina C, vitamina A, taurina, piruvato y cisteamina que actúan como mecanismo de defensa no enzimática. La vía de las pentosas fosfato produce ribosa 5-fosfato y fosforibosil pirofosfato que estimulan la ruptura de la vesícula germinal en ovocitos. La provocación de la vía de las pentosas fosfato tanto con FSH como con estimulantes químicos (pirolina carboxilato o fenazina etosulfato) promueven la meiosis a la metafase II, aumentando de así el número de ovocitos maduros (Eshtiyaghi, et al. 2016).

Las mitocondrias son importantes para el funcionamiento celular por la producción de ATP, regulan el ciclo de Krebs, el metabolismo de ácidos grasos, urea y ciertas hormonas, median procesos de muerte celular, regulan el balance iónico y almacenan cofactores importantes para la homeostasis (Tarazona, *Et al.* 2010). Eshtiyaghi, *et al.* (2016) reveló que la adición de jalea real a los medios de maduración disminuye la abundancia de mRNA de los genes relacionados con la apoptosis en ovocitos de ovejas y células del cumulus, a los que se puede atribuir

los compuestos de la jalea real con actividad antioxidante y capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno.

Debido a que las especies reactivas de oxígeno son producidas en mayor cantidad a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, aparentemente altos niveles de actividad mitocondrial son necesarios para los eventos celulares involucrados en la maduración, tal como la maduración nuclear y la competencia meiótica, que comprende la maduración del citoplasma, rearrreglo del citoesqueleto y la acumulación de ARNms necesarios para el desarrollo temprano antes de la activación completa del genoma embrionario. (Tarazona, *et al.* 2010).

En un estudio realizado por Abd-Allah S. (2012) en el cual comparó la viabilidad de ovocitos de ovejas egipcias suplementando el medio de maduración con diferentes concentraciones de jalea real, encontró que la viabilidad de los ovocitos madurados *in vitro* con 0.5% de jalea real en el medio era del 94% contrastando con 60% del grupo control.

Chen D., *et al* en el 2016 realizó un experimento cultivando líneas celulares humanas suplementando a un grupo con suero fetal bovino (SFB) y otro con las principales proteínas de jalea real (MRJP por sus siglas en inglés) en el cual observaron una mejoría en la viabilidad de las células a las que se les adicionó MRJP de 18.73% a 56.19%, también encontraron que mejoraba la proliferación de células en las placas, llegando a la conclusión de que los MRJP podrían reemplazar parcialmente el FBS.

En investigaciones previas se ha encontrado que el extracto acuoso de jalea real tiene muchas proteínas y las fracciones de proteínas de las cuales tienen una alta actividad antioxidante y capacidad de eliminación contra las especies de oxígeno activo, aunque existe poca información sobre sus propiedades antioxidantes en el desarrollo embrionario (Eshtiyaghi, *et al.*, 2016).

El principal factor atribuido a la extensión de la vida útil fue la propiedad antioxidante de las MRJP. En abejas que fueron alimentadas con jalea real se puede observar que los niveles de Super Oxido Dismutasa eran más elevados, lo que supone un mayor efecto antioxidante en el organismo (*Koomankode, et al. 2018*). Las superóxido dismutasas son un grupo de metaloenzimas esenciales para la defensa contra la toxicidad, causada por los metabolitos parcialmente reducidos que se generan durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. El radical superóxido puede seguir reduciéndose secuencialmente y dar lugar a otros radicales libres más reactivos y peligrosos como es el hidroxilo, de ahí la importancia de neutralizar el superóxido. Estas enzimas catalizan la reacción de transformación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno (Domínguez A., 2006). A estos factores es atribuible la mejora obtenida en la viabilidad de los ovocitos en el grupo suplementado con jalea real en el presente estudio.

Por otro lado los compuestos fenólicos son compuestos químicos considerados metabolitos secundarios de las plantas, bien conocidos por su propiedad antioxidante contra los radicales superóxido, relacionado con el efecto quelante de estos para los metales pesados y varios de sus derivados son muy eficientes para prevenir la autooxidación, los compuestos fenólicos presentes en la jalea real son andrografolida, ácido benzoico, ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster diisooctílico, linuron, estragol y trans-anetol (*Eshtiyaghi, et al. 2016*).

Los compuestos de ácidos grasos más abundantes en la jalea real analizados por espectrometría de gases fueron; el ácido linoleico (ácido graso omega-6 poliinsaturado) y el ácido oleico (ácido graso omega-9 monoinsaturado). El ácido oleico tiene efectos anticancerígenos y de estrés antioxidante. Además, el ácido hexadecanoico y el ácido 10-hidroxi-2-decanoico, también pueden contribuir a la actividad antioxidante (*Eshtiyaghi, et al. 2016*). Por otra parte el ácido araquidónico es el precursor más abundante de prostaglandinas, se deriva del metabolismo del ácido linoleico y se almacena formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular (*Fernández J. et al, 2015*).

Las células poseen diversos mecanismos para contrarrestar el efecto de las especies reactivas de oxígeno, fundamentalmente es a través de los sistemas enzimáticos de catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas dependientes de Cu, Zn y Mn (Tarazona, *et al.* 2010). La jalea real cuenta con Cu, Zn y Mn, pero además contiene Mg, K, Na, Fe, todos ellos intervienen en una multitud de funciones biológicas que en conjunto disminuye la liberación de especies reactivas de oxígeno (Ramadana & Al-Ghamdi, 2012).

Debido a que los medios utilizados en la maduración *in vitro* requieren una similitud al proceso fisiológico *in vivo*, los nutrientes que contienen pueden permitir el desarrollo de microorganismos no deseados que contaminen el medio de cultivo. En este sentido se tiene conocimiento de que la jalea real ha demostrado un efecto bactericida de tal forma que puede prevenir la contaminación durante el proceso de cultivo *in vitro*. La jalea real contiene MRJPs, jelleines y royalactin, estos son los principales factores que proporcionan la actividad antibacteriana a la jalea real especialmente contra bacterias Gram positivas. La mayoría de los jelleines son péptidos antibacterianos derivados del extremo C de MRJP1. jelleines I a III son efectivos contra bacterias Gram-positivas, Gramnegativas y levaduras. Los péptidos antimicrobianos catiónicos están generalmente presentes en 12 a 50 residuos de aminoácidos con una carga neta positiva de 2+ o 7+ (Ganapathi, *et al.* 2018). La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en los Gram positivos o los lipopolisacáridos en los Gram negativos. Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente en las bacterias (Téllez & Castaño, 2010).

Uno de los factores determinantes en la maduración *in vitro* de ovocitos es la maduración citoplasmática que comprende numerosos eventos, como síntesis,

fosforilación de proteínas y activación de caminos metabólicos. Estos cambios son esenciales para una normal fecundación y desarrollo de los embriones. Se ha demostrado que los cigotos y los blastocistos son menos resistentes que los embriones de 9-16 células a un estrés oxidativo causado por peróxido y debido a ello, un gran número de cigotos no logra avanzar más allá del estadio de 5-8 células (De Matos D. 1999). Se intuye que la protección antioxidante dada por la jalea real en el medio de maduración mejoró los resultados del desarrollo embrionario en el grupo suplementado con jalea real en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Al adicionar el extracto acuoso de jalea real al medio de maduración de ovocitos de bovino se ve un incremento en el número de ovocitos madurados comparado con el grupo control. Se puede concluir que el efecto antioxidante de la jalea real en el medio de maduración es bueno, mejorando sustancialmente la maduración de los ovocitos *in vitro* y así también las posibilidades de obtener embriones *in vitro*.

RECOMENDACIONES

Es necesario hacer pruebas a la jalea real que se vaya a emplear, para saber con certeza los componentes que contiene con actividad antioxidante en ella.

Se necesita tener especial cuidado en la esterilidad en la manipulación de los ovocitos, para evitar de esta forma alterar los resultados de los experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Allah S. (2012). Effect of Royal Jelly on Viability and *in vitro* Maturation of Egyptian Sheep Oocytes in Serum Supplemented Medium. *British Journal of Pharmacology Toxicology* 3 (1): 29-32
- Álvarez G. (2010). Estudio del perfil metabólico de los complejos ovocito-cumulus porcinos en la maduración *in vitro*. Tesis para título de Médico Veterinario Universidad de Buenos Aires, Argentina. Consultado el 3 de enero del 2019 de http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_1559.dir/1559.PDF p. 46-47
- Chen D., Xin X., Qian H., Yu Z., Shen L. (2016). Evaluation of the major royal jelly proteins as an alternative to fetal bovine serum in culturing human cell lines. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 17(6):476-483
- De Matos D. (1999). Producción de embriones de bovino *in vitro*: Estimulación de la síntesis de glutatión durante la maduración *in vitro* de ocitos y su efecto sobre el desarrollo de los embriones. Tesis para grado de doctor en ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Consultado el 16 de septiembre del 2019 de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3135_DeMatos.pdf p. 151-153
- Domínguez A. (2006). Modificación de la superóxido dismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas. *Biotecnología Aplicada* 2006 (23); 11-16
- Eshtiyaghi M., Deldar H., Pirsaraei Z A y Shohreh B. (2016). 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*. 86 (9): 2210-2221
- Fernández J., Zapata E., Santiesteban X., Lescay O., Rosell L. (2015). Uso y abuso de las prostaglandinas. *MEDISAN* 2015; 19(1):113
- Kcot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J y Musik I. (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018 (7074209): 29.
- León M., Cedeño R., Rivero R., Rivero J., García D., Bordón L. (2018). La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. *Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, Cuba*. 16: (5) 699-710.

- Membrillo A, Córdova A, Hicks J, Olivares M, Martínez V y Valencia J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una Revisión Internacional, 28 (12): 699-704.
- Peláez V. A. (2011). Producción *in vitro* de embriones de bovino. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. Monografía previa a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista. Consultado el 3 de enero 2019 de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf> p. 52-59.
- Ramadana M., Al-Ghamdi A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS 4 (1); 39–52
- SPSS (IBM SPSS Statistics 22, 2013).
- Tarazona A., Olivera-Angel M., Lenis Y. (2010). Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Archivos de medicina veterinaria.42 (3): 125-133.
- Téllez G., Castaño J. (2010). Péptidos antimicrobianos. Infectio 14 (1); 55-67
- Vélez IC, Chica A, Urrego R, Torres V, Jimenez-Escobar C, Zambrano-Varon J. (2017). Producción *in vitro* de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. Rev. CES Med. Vet. Zoot. 12 (2): 76-87.
- Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, Yamagata K y Sugimura S. (2018). Live-cell imaging of nuclear–chromosomal dynamics in bovine *in vitro* fertilised embryos. Scientific Reports. 8 (7460): 46.
- Zahmatkesh E, Gholamreza N y Vahid N. (2015). Protective Effect of Royal Jelly on *In Vitro* Fertilization (IVF) in Male Mice Treated with Oxymetholone. Cell J. 17 (3): 569–575.