





## Efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad ovocitaria en ratones hembra de la cepa cd-1

### Effect of conjugated linoleic acid on oocyte quality in female cd-1 mice

Iván Gandeaga-Flores<sup>1</sup>,  
 Víctor Manuel Meza-Villalvazo<sup>1\*</sup> ,  
 Paul Sánchez-Ocampo<sup>1</sup> ,  
 Jacqueline Capataz-Tafur<sup>1</sup> ,  
 Andrés Aguirre-Cruz<sup>1</sup> ,  
 Julio Porfirio Ramón Ugalde<sup>2</sup> ,  
 Adael Bernal Del Sol<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca, México.

<sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México. Campus Conkal, Yucatán. Antigua Carretera Mérida-Motul km 16.3, CP. 97345, Conkal, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical, Cotorro Ave 101 e / 100 y 62 No. 6214 Loma de Tierra, La Habana, Cuba.

\*Autor de correspondencia: meza1077@hotmail.com

#### Nota científica

Recibida: 03 de julio 2020

Aceptada: 29 de octubre de 2020

**Como citar:** Gandeaga-Flores I, Meza-Villalvazo VM, Sánchez-Ocampo P, Capataz-Tafur J, Aguirre-Cruz A, Ramón Ugalde JP, Del Sol AB (2020) Efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad ovocitaria en ratones hembra de la cepa cd-1. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7(3): e2666. DOI: 10.19136/era.a7n3.2666

**RESUMEN.** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad y acumulación de lípidos en ovocitos de ratonas de la cepa CD-1, las hembras se distribuyeron en dos grupos: control (TCON: n: 5) y ácido linoleico conjugado (TCLA: n: 5), se alimentaron durante 21 días. 53 h post tratamiento fueron sacrificadas para la recuperación de los ovocitos, los cuales fueron teñidos con rojo de Nilo y observados bajo fluorescencia. El grupo TCLA presentó un 25% más de ovocitos recuperados en comparación a TCON, con un 63% de ovocitos de excelente y buena calidad ( $p \leq 0.05$ ), la concentración de lípidos en el grupo TCLA fue menor ( $145.8 \pm 17.8$ ) en comparación con TCON ( $246 \pm 13.1$ ) ( $p < 0.05$ ). La adición de ácido linoleico conjugado en la dieta de ratones hembra de la cepa CD-1 incrementa el número, calidad de ovocitos y disminuye la acumulación de lípidos en los mismos.

**Palabras clave:** Ácidos grasos poliinsaturados, concentración de lípidos, calidad ovocitaria, ácido linoleico conjugado.

**ABSTRACT.** The objective of the present study was to evaluate the effect of conjugated linoleic acid on the quality and accumulation of lipids in oocytes of mice of the CD-1 strain. The females were distributed in two groups: control (TCON: n: 5) and conjugated linoleic acid (TCLA: n: 5), they were fed during 21 days. 53 h after treatment were sacrificed for the recovery of the oocytes, which were stained with Nile Red and observed under fluorescence. The TCLA group presented 25% more recovered oocytes compared to TCON, with 63% of oocytes of excellent and good quality ( $p \leq 0.05$ ), the lipid concentration in the TCLA group was lower ( $145.8 \pm 17.8$ ) compared to TCON ( $246 \pm 13.1$ ) ( $p < 0.05$ ). The addition of conjugated linoleic acid in the diet of female CD-1 mice increases the number and quality of oocytes and decreases the accumulation of lipids in them.

**Key words:** Polyunsaturated fatty acids, lipid concentration, oocyte quality, conjugated linoleic acid.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son nutrientes claves para múltiples funciones biológicas en el organismo, desde el almacén de energía, componente de membranas celulares, precursores de sustancias metabólicamente activas, y la activación de genes o factores de transcripción (Yang *et al.* 2012). Sin embargo, no pueden ser sintetizados por los tejidos animales, por lo tanto, deben ser incorporados en la dieta y se les denomina como esenciales (Jenkins *et al.* 2008). En caso específico del ovocito, forman parte importante de la membrana celular (en forma de fosfolípidos) y del fluido folicular, lo que les permite afectar notablemente el microambiente del ovocito y jugar un papel fundamental en la calidad (Meza *et al.* 2014). A nivel ovocitario, los AGPI son incorporados en la membrana celular o pueden ser incorporados a través de gotas lipídicas sintetizadas en el citoplasma, estas gotas de grasa se originan de los ácidos grasos extracelulares (provenientes de la circulación sanguínea) o de los sintetizados de novo. En el caso del ovocito, el origen de los ácidos grasos (AG) permanece incierto, aunque cada día existen más evidencias que permiten aseverar que esta célula es capaz de incorporar AG provenientes de su alrededor (Aardema 2014).

La composición de los AG almacenados en el ovocito, se correlacionan con el desarrollo de las capacidades de esta célula. Los AG en líquido folicular pueden mediar e influenciar el nivel de expansión de células del cumulus y tiempo de reanudación de la maduración nuclear en los ovocitos, aspectos críticos para el desarrollo embrionario después de la fecundación *in vitro* (Marei *et al.* 2010). Sin embargo, una acumulación excesiva de AG provoca hiperlipidemia reduciendo su desarrollo a estadios embrionarios avanzados debido a que aumentan su vulnerabilidad al estrés oxidativo (Leroy *et al.* 2010). Durante su crecimiento y maduración, el metabolismo energético se acelera e incrementa la presencia de especies reactivas al oxígeno (Bradley y Swan 2019). Se ha demostrado que el ácido linoleico conjugado (CLA) posee actividad antioxidante cuando es comparado con antioxidantes sintéticos convencionales.

Estudios *in vitro* demuestran que la adición en los medios de cultivo del isómero de CLA (*cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12) reducen la acumulación excesiva de lípidos, disminuyendo la hiperlipidemia que caracteriza a los embriones cultivados *in vitro*, mejorando su resistencia y tolerancia a la manipulación aumentando la competencia de ovocitos para convertirse en embriones de mejor calidad (Lapa *et al.* 2011, Batista *et al.* 2014). Sin embargo, se sabe poco acerca de la captación específica de AG al interior del foliculo y cómo éste puede ser alterado por la dieta. Es importante resaltar que bajo condiciones *in vitro* el CLA no está expuesto al metabolismo propio del animal, factor que pudiera condicionar su efecto biológico, por lo que es necesario estudiar los aspectos intrínsecos del animal cuando son suplementados con CLA. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad y acumulación de lípidos en ovocitos de ratonas de la cepa CD-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y Alimentación

Se emplearon 10 ratonas de la cepa CD-1, con peso vivo (PV) de  $35 \pm 5$  g y edad promedio de  $65 \pm 8$  días al inicio del experimento, las cuales fueron distribuidas en dos tratamientos: grupo control (TCON:  $n = 5$ ) y grupo suplementado con ácido linoleico conjugado (TCLA:  $n = 5$ ), ambos grupos recibieron 15 g diarios de alimento comercial (NUTRI-CUBOS<sup>®</sup>) por la mañana y agua *ad libitum*, el grupo TCLA recibieron 1.5 g (5% PV) de CLA vía oral, durante 21 días (Kostogryns y Pisulewski, 2010) El protocolo experimental fue aprobado (UNPA/CBE/025) por el comité de Bioética de la universidad del Papaloapan. Los animales fueron tratados con humanidad y con respeto para sufrimiento.

### Superovulación, obtención y evaluación ovocitaria

El día 21 del tratamiento las hembras recibieron 5 UI de Gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG: SINCROPART<sup>TM</sup>) vía intraperitoneal,

48 h post a la aplicación de PMSG recibieron 5 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG: Choragon<sup>®</sup>), 15 h posteriores a la aplicación de la hCG las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se aislaron los oviductos, sección comprendida entre el cuerno uterino y el ovario, se localizó el ámpula, la cual se diseccionó con ayuda de unas pinzas para la liberación de los ovocitos (Duselis y Vrana 2007), los cuales fueron colocados en suero fisiológico atemperado a 37 °C, para su clasificación. La clasificación de la calidad ovocitaria se realizó con una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800N Zoom stereomicrope) en cuatro categorías según lo descrito por Patricio *et al.* (2003).

1) Excelente: cúmulos compacto (> 4 a 5 capas) con un ooplasma homogéneo, 2) Buena: cúmulo compacto de una o dos capas con ooplasma homogéneo que tiene una apariencia gruesa, 3) Regular: menos cúmulo compacto (ligeramente ampliado cúmulos) con ooplasma irregulares que contienen grupos oscuros, y 4) Mala: ovocitos desnudos y ooplasmas irregulares.

#### Tinción de ovocitos con Rojo de Nilo

Los ovocitos se desnudaron mediante agitación con un vórtex por 5 min con el propósito de eliminar las células del cúmulo, una vez desnudados se fijaron en un porta objeto con 500  $\mu$ L de glutaraldehído al 2% y solución de formaldehído al 2% durante 24 h en completa oscuridad. Posteriormente, se le adicionaron 30  $\mu$ L de solución Rojo de Nilo (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Rojo de Nilo; 20% dimetil sulfóxido (DMSO); disuelto en solución salina: 0.9% de NaCl y se dejaron reposar a temperatura ambiente en completa oscuridad por 24 h.

#### Evaluación y cuantificación gotas lipídicas por fluorescencia

La concentración de lípidos se cuantificó con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS) con el objetivo de 40X. Las imágenes se capturaron por separado utilizando filtros monocromáticos para FITC (excitación 400-500 nm y una emisión de 515 LP) con una cámara (Evolución<sup>™</sup> Mp Color) acoplada al sistema de microscopía, la cuantificación

de la luz de fluorescencia fue realizada con la ayuda del software QUANTIPORO (ImageJ). Las unidades se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

#### Análisis estadístico

Las unidades arbitrarias de fluorescencia se sometieron a la prueba de Bartlett para probar su normalidad y la homocedasticidad, posteriormente se les aplicó un análisis de varianza para evaluar diferencias significativas, la calidad de los ovocitos fue analizada mediante una prueba de Chi-cuadrada.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total y calidad de ovocitos obtenidos se presentan en la Tabla 1. Se observó un incremento del 25% ( $p \leq 0.05$ ) de ovocitos recuperados a favor del grupo alimentado con CLA en comparación al grupo control. El grupo TCLA presentan un 63% de ovocitos de excelente y buena calidad contra un 37% del grupo TC, y un menor porcentaje de estructuras ovocitarias de mala calidad. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero en evaluar el efecto del CLA sobre calidad y concentración de lípidos en ovocitos bajo condiciones *in vivo*, y los resultados que soporten esta evidencia en modelos murinos son escasos. Pero hay varios reportes del efecto de uso de los ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo folicular, aumento del número de folículos y ovocitos (Zeron *et al.* 2002, Meza *et al.* 2014) y calidad (McEvoy *et al.* 2012, Meza *et al.* 2013) en algunas especies de rumiantes (Ovinos y Bovinos). Los resultados pueden atribuirse a los componentes de la dieta, ya que se ha demostrado que los componentes dietarios tienen influencia sobre el desarrollo folicular y la composición del líquido folicular (LF), ya que estos una vez son metabolizados por el sistema digestivo e integrados al torrente sanguíneo, para luego ser transportados al LF (Aardema 2014). Lo que impacta en la calidad ovocitaria (Meza *et al.* 2014), ya que el ovocito tiene la capacidad de seleccionar ciertos AG y activar determinadas rutas metabólicas que influyen en la maduración y desarrollo de las competencias necesarias para su fertilización (Kim *et al.* 2001).

Lo que puede mediar e influenciar el nivel de expansión de células del cúmulus y tiempo de reanudación de la maduración nuclear en los ovocitos, aspectos críticos para el desarrollo después de la fecundación (Marei *et al.* 2010). El LF también contiene AG libres (Jungheim *et al.* 2011), con los cuales las células del cumulus tienen contacto directo, siendo la única barrera entre el LF y el ovocito. La expresión del ácido graso translocasa CD36 en este tipo celular indica que son capaces de incorporar los AG en su interior proveniente de su entorno (Aardema *et al.* 2013).

**Tabla 1.** Número total y calidad ovocitaria de ratonas de la cepa CD-1 alimentada con CLA.

Tratamiento	Calidad ovocitaria				Total
	Excelente	Buena	Regular	Malo	
TCLA	34 <sup>bA</sup>	49 <sup>aA</sup>	30 <sup>bA</sup>	17 <sup>cB</sup>	130 <sup>A</sup>
TCON	22 <sup>bB</sup>	14 <sup>cB</sup>	21 <sup>bB</sup>	40 <sup>aA</sup>	97 <sup>B</sup>

**a,b,c:** literales entre filas presentan diferencias significativas entre calidad, **ABC:** literales entre columnas representan diferencia significativa entre tratamientos. **TCLA:** Tratamiento con ácido linoleico conjugado, **TCON:** Tratamiento Control.

La presencia de ácido linoleico es inofensiva en altas concentraciones y puede compensar los efectos lipotóxicos de los ácidos grasos saturados mejorando la competencia de los ovocitos (Aardema *et al.* 2013). Sin embargo, una acumulación excesiva de ácidos grasos provoca hiperlipidemia reduciendo su desarrollo a estadios embrionarios avanzados, debido a que aumentan su vulnerabilidad al estrés oxidativo (Leroy *et al.* 2010). Durante su crecimiento y maduración, el metabolismo energético se acelera e incrementa la presencia de especies reactivas al oxígeno (Bradley y Swan 2019). Pero la presencia de CLA (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10,) en LF pudiera poseer capacidad atrapante de radicales libres (Yu 2001), inhibiendo su efecto y favoreciendo la calidad ovocitaria *in vivo* (Meza *et al.* 2013, 2014).

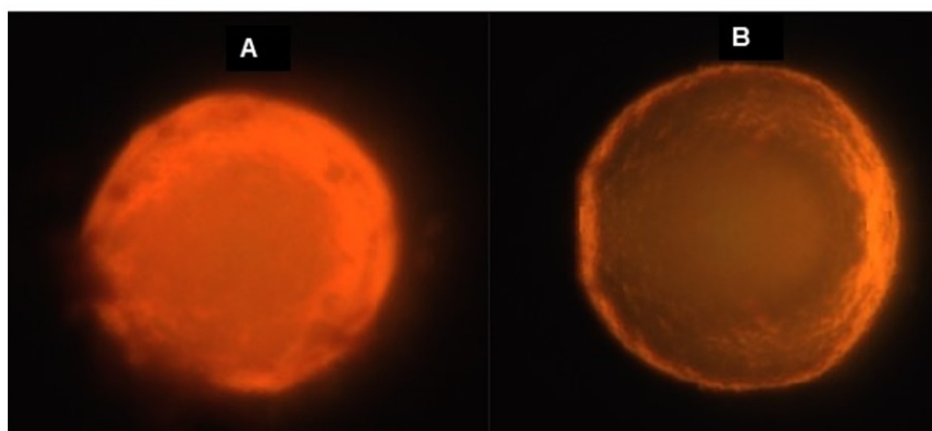
La concentración general de lípidos expresada como unidades arbitrarias de fluorescencia, sin considerar la calidad de los ovocitos, fue menor en el grupo TCLA ( $145.8 \leq 17.8$ ) en comparación al grupo TCON ( $246 \pm 13.1$ ) ( $p < 0.05$ ). La concentración de lípidos de acuerdo a la calidad ovocitaria dentro de tratamientos y entre tratamientos (Tabla 2) presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). En la Figura 1 se

observa menor concentración de lípidos en ovocitos de excelente calidad para el grupo TCLA en comparación con el grupo TCON. Conforme la calidad de las estructuras decrece presentan menor concentración de lípidos, los ovocitos del grupo TCLA presentan una menor concentración de lípidos en cada una de las calidades en comparación con el que el grupo TCON ( $p < 0.05$ ). Los resultados del estudio concuerdan con lo reportado por Lapa *et al.* (2011), quienes demuestran que la suplementación de CLA reduce la acumulación excesiva de lípidos en el ovocito bajo condiciones *in vitro*, dando lugar a un incremento del 60.7% de ovocitos de excelente calidad, mejorando su resistencia y tolerancia a la manipulación, aumentando las probabilidades del ovocito para convertirse en embriones de mejor calidad y disminuyendo la deposición citoplasmática de lípidos (Pereira *et al.* 2007). Los lípidos intracelulares en los ovocitos se almacenan principalmente en gotas lipídicas (GL) que proporcionan energía (Jin *et al.* 2017), a través de la  $\beta$ -oxidación (Paczkowski *et al.* 2013), para un crecimiento y desarrollo adecuado, moléculas que actúan en los procesos de señalización implicados en los mecanismos de regulación del proceso de maduración y competencia del ovocito (Prates *et al.* 2014). La suplementación de CLA durante las diferentes etapas de la producción *in vitro* de embriones bovinos ha demostrado alterar el perfil de lípidos de la membrana con respecto a los fosfolípidos, lo que puede deberse a alguna supuesta remodelación y/o renovación (Leão *et al.* 2015a, Borges y Vireque 2019). Al respecto, se han identificado especies de fosfolípidos como marcadores de la criotolerancia de los blastocitos bovinos (Sudano *et al.* 2012) y la abundancia de fosfatidilcolinas en los embriones parecen funcionar como un biomarcador prospectivo para la crioconservación (Leão *et al.* 2015b, 2017). La suplementación con CLA durante todo el proceso de cultivo de embriones bovinos, muestran una reducción de los niveles de lípidos y mayor crioresistencia (Pena *et al.* 2019), efectos que pueden deberse a la modulación y ralentización de agua, y crioprotectores mediados por el CLA (Matos *et al.* 2015). Por otra parte, el CLA es capaz de cambiar el perfil de los ácidos grasos, influyendo en los niveles de triglicéridos o afectando

**Tabla 2.** Unidades arbitrarias de fluorescencia de ovocitos de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA en las distintas calidades de ovocitos.

Tratamiento	Calidad Ovocitaria			
	Excelente	Buena	Regular	Mala
TCLA	197.20 ± 17.94 <sup>aB</sup>	158.00 ± 20.43 <sup>bB</sup>	122.50 ± 15.09 <sup>cB</sup>	105.50 ± 17.92 <sup>cB</sup>
TCON	348.20 ± 19.17 <sup>aA</sup>	277.80 ± 10.75 <sup>bA</sup>	182.10 ± 18.07 <sup>cA</sup>	178.90 ± 14.84 <sup>cA</sup>

**a,b,c:** literales entre filas presentan diferencias significativas entre calidad, **ABC:** literales entre columnas representan diferencia significativa entre tratamientos. **TCLA:** Tratamiento con ácido linoleico conjugado, **TCON:** Tratamiento Control.



**Figura 1.** Contenido de lípidos en ovocitos de excelente calidad obtenidos de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA. Imagen representativa de los ovocitos (A) grupo control, (B) grupo tratado con CLA y teñidos con Rojo de Nilo. La fluorescencia fue observada en objetivo 40X.

los niveles de AG tanto saturados como insaturados, posiblemente inhibiendo la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas lipogénicas y la actividad de la lipoproteína lipasa (Park *et al.* 1997). Embriones bovinos cultivados con diferentes AGPI muestran reducción en los niveles de transcripción del gen desaturasa de ácido graso 2 (FADS2) sin afectar los niveles de transcripción de otros genes asociados con el metabolismo lipídico, esta baja regulación del FADS2 puede inducir la reducción del contenido de lípidos en los embriones, debido a que la enzima cataliza la biosíntesis de los precursores utilizados en la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (Al Darwich *et al.* 2010).

El mecanismo exacto a través del cual el CLA impacta la concentración de lípidos en el presente estudio podría ser a través de la vía de transducción de la proteína quinasa A PKA y la cascada de reacciones de Adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Ashwell *et al.* 2010). En adipocitos humanos cultivados en presencia de CLA, se identificó un aumento en la

lipólisis y perilipina citosólica asociada a GL de menor tamaño (Chung *et al.* 2005). Por lo tanto, es posible que la proteína quinasa A (PKA) y las rutas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), quinasas extracelulares reguladas por señales (ERK) pudieran estar reguladas por el CLA, interfiriendo con la lipólisis de la GL y el contenido de AG de los ovocitos. Un análisis de la composición AG y plasmalógenos (DMA) en complejos cúmulos ovocito de porcinos, mostraron que independientemente el tipo de célula, que el tratamiento con CLA, reduce las proporciones de diversos AG de manera individual y plasmalógenos (DMA 16:0, c9-16:1, 18:3 n-6) (Prates *et al.* 2013). El AG liberado o la acumulación de CLA puede seguir la  $\beta$ -oxidación mitocondrial para producir energía para la maduración progresiva o la síntesis de AG puede ser usada en la formación de células durante el desarrollo embrionario (Dunning *et al.* 2014).

Los resultados preliminares del CLA sobre la calidad y acumulación de lípidos en ovocitos de ra-

tonas de la cepa CD-1, como perspectivas, merece la pena seguir explorando el efecto del CLA sobre crioconservación de los ovocitos y su desarrollo post crioconservación, así como la expresión de genes ligados a la calidad ovocitaria. La adición de ácido linoleico conjugado en la dieta de ratones hembra

de la cepa CD-1 favorece el número, y calidad de ovocitos, y disminuye la acumulación de lípidos en los mismos bajo condiciones *in vivo*. Por lo que el CLA puede ser una estrategia favorable para aumentar la crioconservación de los ovocitos, en los sistemas de producción de embriones *in vitro*.

### LITERATURA CITADA

- Aardema H (2014) Impact of free fatty acid composition on oocyte developmental competence in dairy cows. *Faculty of Veterinary Medicine* 94: 618-637.
- Aardema H, Lolicato F, Van de Lest CH, Brouwers JF, Vaandrager AB, Van Tol HT, Roelen BA, Vos PL, Helms JB, Gadella BM (2013) Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biology of Reproduction* 6: 1-15.
- Al Darwich A, Perreau CP, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P, Guignot F (2010) Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF derived bovine embryos. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 93: 30-36.
- Ashwell MS, Ceddia RP, House RL, Cassady JP, Eisen EJ, Eling TE, Collins JB, Grissom SF, Odle J (2010) Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters hepatic gene expression in a polygenic obese line of mice displaying hepatic lipidosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 848-855.
- Batista RI, Raposo NR, Campos-Junior PH, Pereira MM, Camargo LS, Carvalho BC, Gama MA, Viana JH (2014) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-produced crossbred bovine embryos. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5: 3-8.
- Borges DE, Vireque AA (2019) Updating the impact of lipid metabolism modulation and lipidomic profiling on oocyte cryopreservation. *European Medical Journal* 4: 79-87.
- Bradley J, Swann K (2019) Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *The International Journal of Developmental Biology* 63: 93-103
- Chung S, Brown JM, Sandberg MB, McIntosh M (2005) Trans-10, cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling. *The Journal of Lipid Research* 46: 885-895.
- Dunning KR, Russell DL, Robker, RL (2014) Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. *Reproduction* 148: 15-27.
- Duselis AR, Vrana PB (2007) Retrieval of Mouse Oocytes. *Journal of Visualized Experiments* 3e185. Doi: 10.3791/185.
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE (2008) Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Animal Science* 86: 399-412.
- Jin JX, Lee S, Taweetchaipaisankul A, Kim GA, Lee BC (2017) Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*. 62(2) e12388. Doi: 10.1111/JPI.12388.
- Jungheim ES, Macones GA, Odem RR, Patterson BW, Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH (2011) Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 95: 1970-1974.

- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed 1 $\mu$  Mature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction Fertility* 122: 131-138.
- Kostogrysb RB, Pisulewski PM (2010) Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on lipid profile and liver histology in laboratory rats fed high-fructose diet. *Environmental toxicology and pharmacology* 30: 245-250.
- Lapa M, Marquez CC, Alves SP, Vasques MI, Baptista MC, Carvalhais I, Silva-Pereira M, Horta AE, Bessa RJ, Pereira RM (2011) Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. *Reproduction in domestic animals* 46: 906-910.
- Leão BC, Rocha-Frigoni NA, Cabral EC, Coelho MB, Ferreira CR, Eberlin MN (2015a) Improved embryonic cryosurvival observed after *in vitro* supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology* 84: 127-136.
- Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Cabral EC, Franco MF, Ferreira CR, Eberlin MN, Filgueiras PR, Mingoti GZ (2015b) Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. *Zygote* 23: 732-741.
- Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Nogueira É, Cabral EC, Ferreira C R, Eberlin MN, Accorsi MF, Neves TV, Mingoti GZ (2017) Membrane lipid profile of *in vitro*-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers. *Reproduction Fertility and Development* 29: 1217-1230.
- Leroy MR, Hoeck VV, Clemente M, Rizos D, Gutierrez AA, Soom VA, Uytterhoeven M, Bols PE (2010) The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. *Human Reproduction* 25: 768-778.
- Marei W, Wathe D, Fouladi-Nashta A (2010) Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction fertility* 139: 979-988.
- Matos JE, Marques CC, Moura TF, Baptista CM, Horta EMA, Soveral G, Pereira RMLN (2015) Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Reproductive. Biology and Endocrinology* 13: 1-8.
- McEvoy TG, Onal AG, Speake BK, Robinson JJ (2012) Impact of contrasting fish oil concentrations in the diet on ovine embryo development *in vivo* and of corresponding diet-specific derivative sera during *in vitro* culture. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21: 31-48.
- Meza-Villalvazo, VM, Magaña SH, Sandoval CC, Morales MR, Chay-Canul A, Trejo CA (2013) Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre población folicular y calidad ovocitaria en ovejas Pelibuey. *Universidad y Ciencia* 29: 255-261.
- Meza-Villalvazo, VM, Trejo CA, Magaña SH, Sandoval CC, Chay-Canul A, Cavazos GA, Martínez-Sánchez C (2014) Perfil metabólico de isómeros de ácido linoleico conjugado y calidad de ovocitos en ovejas de pelo. *Nova Scientia* 12: 287-303.
- Paczkowski M, Silva E, Schoolcraft W, Krisher R (2013) Comparative importance of fatty acid beta-oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus oocyte complexes. *Biology of Reproduction* 88: 1-11.
- Park SE, Son WY, Lee KA, Ko JJ, Cha KY (1997) Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertility and Sterility* 68: 920-926.
- Patricio P, Tucker MJ, Guelman V (2003) Atlas de reproducción asistida. Editorial McGraw Hill, México. 36-37.

- Pena CB, de Queirós CF, Detoni D, Borges FR, Burla DAJ (2019) Use of conjugated linoleic acid (*trans* 10, *cis* 12) to cultivate bovine embryos: effect on cryoresistance and lipid content. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 48: e20180322. Doi: 10.1590/rbz4820180322.
- Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portuga PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira MS, Marques CC (2007) Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid (t10, c12 CLA). *Animal Reproduction Science* 98: 293-301.
- Prates EG, Alves SP, Marques CC, Baptista MC, Horta AEM, Bessa RJB, Pereira RM (2013) Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulator *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (t10, c12 CLA) and forskolin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 49: 335-345.
- Prates EG, Nunes J, Pereira R (2014) A role of lipid metabolism during cumulus oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators of inflammation* 2014: 17620074. Doi: 10.1155/2014/692067.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD (2012) Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biology Reproduction* 87: 130. Doi: 10.1095/biolreprod.112.102897.
- Yang X, Wu LI, Chura Lr, Liang X, Lane M, Norman RJ, Robker RL (2012) Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. *Fertility and sterility* 97: 1438-1443
- Yu L (2001) Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3452-3456.
- Zeron Y, Sklan D, Arav A (2002) Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Molecular Reproduction Development* 61: 271-278.