



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
INGIENERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

“Efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad ovocitaria en ratones  
hembra de la cepa CD-1”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

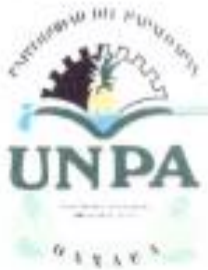
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

IVÁN GANDEAGA FLORES

Director: DR. Víctor Manuel Meza Villalvazo

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2019



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 22 de enero de 2020  
Oficio No. JCIB/007/01/2020

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Iván Gandeaga Flores** titulado "Efecto del ácido linoléico conjugado sobre la calidad de ovocitaria en ratones hembra de la cepa CD-1". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

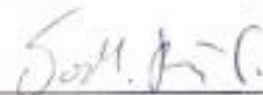
Presidente: Dr. José Abad Zavaleta  
Secretario: Dr. Miguel Ángel Peña Rico  
Vocal: Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo  
Suplente Primero: Dr. Wilber Hernández Montiel  
Suplente Segundo: Dr. Nicolás Valenzuela Jiménez

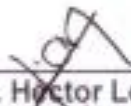
Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

**Atentamente**

*Terra uberrima, mens aperta  
Bœu Lo-tama, chí jí jú*



  
**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

  
**Vo.Bo. M.C. Héctor López Arana**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Victor Manuel Meza Villalvazo, Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Iván Gandeaga Flores, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 22 de enero de 2020 a las 10 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada '**Efecto del ácido linoléico conjugado sobre la calidad de ovocitaria en ratones hembra de la cepa CD-1**' presentada por el alumno Iván Gandeaga Flores, con número de matrícula 12090309, aspirante al título de **Licenciatura**.

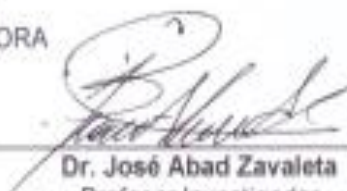
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 22 de enero de 2020



Dr. Victor Manuel Meza Villalvazo  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. José Abad Zavaleta  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



Dr. Miguel Ángel Peña Rico  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



Dr. Paul Sánchez Ocampo  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

## HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de la investigación del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Victor Manuel Meza Villalvazo** por su amistad, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitió en la realización de mi tesis.

Al **Dr. Paul Sanchez Ocampo** por brindarme la confianza y el apoyo durante el desarrollo experimental de la tesis.

Al **MVZ Juan Flores** por haberme apoyado durante mi estadía en el rastro municipal de la ciudad de Tuxtepec Oaxaca.

A la **Dra. Rosalina Reyes Luna** por su amabilidad y su amistad durante la tesis.

Al Dr. **Andres Aguirre Cruz** por brindarme su apoyo y confianza durante mi tesis.

A mis amigos: **Antonio, Daniela, Fernando, Lorena**, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora seguimos siendo amigos.

A la **Universidad del Papaloapan (UNPA)** por otorgarme la confianza y facilidades para realizar mis estudios de licenciatura.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su bendita bondad y amor.

### **A MÍ MADRE**

#### **Julia Flores Valdez**

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

### **A MIS PADRE**

#### **José Luís Gandeaga Armas**

Que los ejemplos de perseverancia y esfuerzo que lo caracteriza y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

### **A MI HERMANA**

#### **Lucero Gandeaga Flores**

Quien me daba con consejos y regaños, para poder culminar esta etapa de mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| INDICE DE TABLAS.....  | ix   |
| INDICE DE FIGURAS.....   | x    |
| RESUMEN .....  | xii  |
| ABSTRACT .....   | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 3    |
| 2.1. Ovocito.....  | 3    |
| 2.2. Partes del ovocito.....   | 3    |
| 2.3. Estructura del ovocito .....  | 4    |
| 2.4. Crecimiento del folículo y del ovocito .....                                    | 4    |
| 2.5. Maduración del ovocito. ....  | 5    |
| 2.6. Estadios de maduración del ovocito.....   | 5    |
| 2.6.1 Vesícula germinal (VG) .....   | 5    |
| 2.6.2. Prometáfase I y Metafase I (MI). ....   | 6    |
| 2.6.3. Ovocito metafase II. ....   | 6    |
| 2.7. Ovulación.....  | 6    |
| 2.8. Tamaño y forma de los ovocitos.....   | 7    |
| 2.9. Superovulación.....   | 7    |
| 2.10. Ácido linoleico conjugado.....   | 7    |
| 2.11. Mecanismo de acción de lípidos y su efecto en la actividad reproductiva.....   | 8    |
| 2.12. Efecto benéfico del ácido linoleico conjugado sobre la calidad ovocitaria..... | 9    |
| 2.13. Identificación de lípidos en ovocitos.....                                     | 10   |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....   | 12   |
| 4. HIPÓTESIS.....  | 13   |
| 5. OBJETIVOS.....  | 14   |
| 5.1. Objetivo principal .....  | 14   |
| 5.2. Objetivos secundarios.....  | 14   |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 15   |

|  |    |
|--|----|
| <b>6.1. Ubicación.</b> .....   | 15 |
| <b>6.2. Animales y Alimentación.</b> .....                           | 15 |
| <b>6.3. Superovulación, obtención y evaluación ovocitaria.</b> ..... | 15 |
| <b>6.4. Tinción de ovocitos con Rojo de Nilo.</b> .....              | 16 |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                               | 18 |
| <b>7.1. Número total y calidad ovocitaria</b> .....                  | 18 |
| <b>7.2. Cuantificación de lípidos</b> .....                          | 20 |
| <b>8. Conclusión</b> .....   | 37 |
| <b>9. Bibliografía</b> .....   | 38 |

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Número total y calidad ovocitaria de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA  
..... 20

**Tabla 2.** Unidades arbitrarias de fluorescencia de ovocitos de ratonas de la cepa CD-1  
alimentadas con CLA en las distintas calidades de ovocitos. .... 24

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Partes que componen al ovocito.....   | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Efecto del CLA en la acumulación de gotas lipídicas.....  | 23 |
| <b>Figura 3.</b> Contenido de lípidos en ovocitos obtenidos de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA. .... | 25 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                                     |                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| AGPI: Ácidos Grasos Poliinsaturado  | mL: Mililitros                    |
| BHT: Butilhidroxitolueno            | NaCl: Cloruro de Sodio            |
| CLA: Ácido Linoleico Conjugado      | LP: Long pass (filtro pasa altos) |
| DMSO: Dimethylsulfoxido             | UI: Unidades Internacionales      |
| FSH: Hormona Folículo Estimulante   | PMSG: Gonadotropina sérica        |
| GL: Gotas lipídicas                 | PV: Peso vivo                     |
| h: Horas                            | S: Segundos                       |
| HCG: Gonadotropina Coriónica Humana | TCLA: Tratamiento con CLA         |
| ICM: masa celular interna           | TCON: Tratamiento Control         |
| LF: Líquido folicular               | ZP: Zona Pelúcida                 |
| LH: Hormona Folículo Leutinizante   | $\mu$ M: Micrómetros              |

## RESUMEN

Se evaluó el efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) en la dieta diaria de ratonas de la cepa CD-1 sobre la calidad y la concentración de gotas lipídicas en el ovocito. Se utilizaron 10 ratonas hembras de la cepa CD-1 con una edad de 6-8 semanas de edad y un peso de  $28.5 \pm 32.8$  g, las cuales fueron distribuidas en dos grupos para su alimentación, TCON: ratonas del grupo control; TCLA: ratonas tratadas con ácido linoleico conjugado (CLA) 5 % p/v vía oral, durante 21 días. Transcurrido este periodo las ratonas fueron sometidas a un tratamiento de superovulación, recibiendo 5 UI de Gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) vía intraperitoneal, 48 h post a la aplicación de la hormona PMSG, recibieron 5 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), 15 h posteriores a la aplicación de la HCG las hembras fueron sacrificadas para recuperar los ovocitos y evaluar la calidad y concentración de gotas lipídicas en el ovocito. El grupo tratado con CLA mostró un efecto positivo con un 25 % a favor en el número de ovocitos recuperados y un 63 % de mejor calidad de ovocitos en comparación con el grupo testigo, así mismo, dichos ovocitos presentan un 40.7 % menos concentración de lipídica que el tratamiento testigo. La adición de CLA en la dieta de ratonas de la cepa CD-1 favorece el número total y calidad de ovocitos reduciendo la acumulación de lípidos en la membrana plasmática del ovocito.

**Palabras Clave:** Ácido linoleico conjugado, gotas lipídicas, calidad ovocitaria.

## ABSTRACT

The effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the daily diet of mice of strain CD-1 on the quality and concentration of lipid drops in the oocyte was evaluated. 10 female mice of the CD-1 strain were used with an age of 6-8 weeks of age and a weight of  $28.5 \pm 32.8$  g, which were distributed in two groups for feeding, TCON: mice of the control group; TCLA: mice treated with conjugated linoleic acid (CLA) 5 % w / v orally, for 21 days. After this period, the mice were subjected to a superovulation treatment, receiving 5 IU of Gonadotropin from pregnant mare serum (PMSG) intraperitoneally, 48 h after the application of the PMSG hormone, they received 5 IU of Human Chorionic Gonadotropin (HCG), 15 h after the application of HCG the females were sacrificed to recover the oocytes and evaluate the quality and concentration of lipid drops in the oocyte. The CLA-treated group showed a positive effect with 25 % in favor of the number of oocytes recovered and 63 % of better oocyte quality compared to the control group. Likewise, these oocytes have a 40.7 % lower lipid concentration than the witness treatment. The addition of CLA in the diet of mice of the strain CD-1 favors the total number and quality of oocytes by reducing the accumulation of lipids in the plasma membrane of the oocyte.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, lipid drops, ovarian quality.

## 1. 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 hasta activación de genes o factores de transcripción. 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, los AGPI 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 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, ha sido correlacionada 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 ácidos grasos provoca hiperlipidemia reduciendo su desarrollo a estadios embrionarios avanzados (Leroy *et al.*, 2010) debido a que aumentan su vulnerabilidad al estrés oxidativo.

Durante su crecimiento y maduración, el metabolismo energético se acelera e incrementa la presencia de especies reactivas al oxígeno (Valco *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el CLA posee dicha actividad antioxidante cuando es comparado con antioxidantes sintéticos convencionales.

Estudios *in vitro* demuestran que la adición en los medios de cultivo del isómero *cis9, trasn11, trans10, cis-12* reduce la acumulación excesiva de lípidos, disminuyendo la hiperlipidemia que se caracteriza en los embriones cultivados *in vitro*, mejorando su resistencia y tolerancia a la manipulación (Pereira *et al.*, 2008) aumentando la competencia de ovocitos para convertirse en embriones de mejor calidad (Lapa *et al.*, 2011). Sin embargo, se sabe poco acerca de la captación específica de ácidos grasos al interior del folículo y cómo éste puede ser alterado por la dieta. Numerosos estudios *in vitro* en diversas especies han demostrado que el perfil lipídico de los ovocitos es dinámico y es influenciado por su ambiente externo permitiéndole a éste desarrollar un proceso selectivo para garantizar su protección y evitar el riesgo de daño celular (Santos *et al.*, 2008).

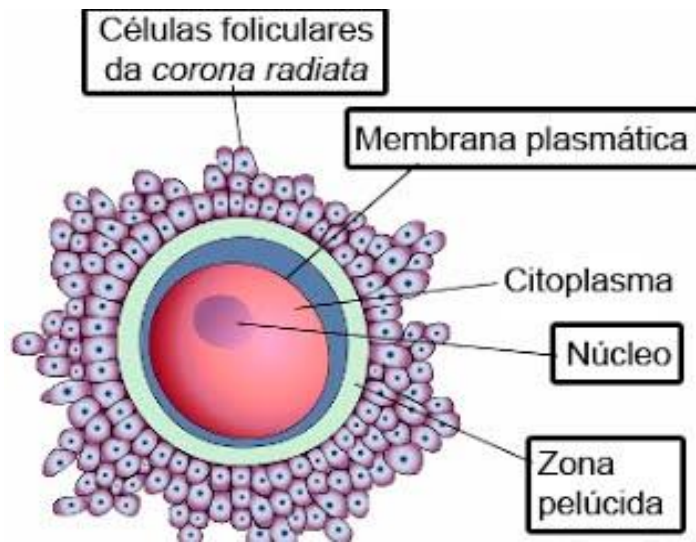
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Ovocito.

Los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea celular germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian dando origen a ovocitos y espermatozoides (Diaz *et al.*, 2007).

### 2.2. Partes del ovocito.

Se identifican las partes principales que constituyen al ovocito (Moore, 2009).



**Figura 1. Partes que componen al ovocito.** Se observan las partes principales de un ovocito, corona, zona pelúcida, membrana plasmática, citoplasma y núcleo.

### **2.3. Estructura del ovocito**

Los ovocitos presentan un tamaño medio de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro en ratones y en humano de 100  $\mu\text{m}$ , los ovocitos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo oóforo (Diaz *et al.*, 2007). Y la parte más interna de la capa de células se denomina corona irradiada, formada por células de la granulosa, que se comunica con el ovocito a través de uniones intercelulares “Gap” (Gilula *et al.*, 1978). Estas conexiones celulares permiten el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con finalidad nutritiva y reguladora, conocido como “cooperación metabólica” (Apa *et al.*, 1994; Hunter, 2000).

### **2.4. Crecimiento del folículo y del ovocito**

El periodo de crecimiento del folículo y del ovocito, se caracteriza por una intensa síntesis proteica y almacenamiento de macromoléculas (Harris *et al.*, 2007). El folículo primordial se transforma en folículo primario, aumenta el volumen del ovocito, aunque sin división celular del mismo y sufre hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar el folículo secundario.

El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal (Pan *et al.*, 2005). En respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH), se forma la cavidad antral, que está llena de líquido folicular (McNatty *et al.*, 1999).

Con el crecimiento del ovocitos se forma la zona pelúcida (ZP) y aumenta el número de orgánulos citoplasmáticos, como mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, todo ello indicativo de la elevada actividad metabólica que permite la síntesis y almacenamiento de RNA, proteínas y enzimas.

## **2.5. Maduración del ovocito.**

La maduración del ovocito hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Picton *et al.*, 2008).

Los ovocitos en folículos primarios y preantrales son incompetentes meióticamente y, por tanto, no maduran espontáneamente si se extraen de sus folículos. Los ovocitos en estadio antral temprano comienzan a crecer en respuesta a la hormona FSH, obtienen competencia meiótica y pueden madurar si se les aísla de sus folículos (Tornell *et al.*, 1990). Se ha descrito que con el crecimiento del folículo se desarrollan receptores LH en células de la granulosa que permiten al ovocito reiniciar la meiosis tras el estímulo hormonal de LH, así como la ovulación del ovocito maduro (Mehlmann, 2005; Richards, 2002).

## **2.6. Estadios de maduración del ovocito**

La maduración nuclear ocurre *in vivo* durante el crecimiento folicular y la ovulación. La relación entre el ovocito y las células foliculares se modifica durante el periodo de maduración como resultado de cambios en la membrana del ovocito y el sistema de señales intracelulares (Picton *et al.*, 2008).

### **2.6.1 Vesícula germinal (VG)**

La vesícula germinal es el estadio del ovocito que se encuentra en profase I y que ha sido persistido a lo largo de las fases tempranas de crecimiento (Sun *et al.*, 2009). La vesícula germinal recibe este nombre atendiendo a la morfología del núcleo del ovocito que es esférico y contiene un núcleo grande, esparcido y de forma discontinua.

### **2.6.2. Prometafase I y Metafase I (MI).**

Se consideran estadios intermedios en la maduración pues se ha completado la profase de la meiosis I. La vesícula germinal y sus nucléolos han desaparecido. Tras recombinarse los cromosomas homólogos, estos se alinean al azar hacia los polos para más tarde segregarse en el ovocito o en el primer corpúsculo polar. Se requieren de 12 a 24 horas en cultivo *in vitro* antes de alcanzar la madurez total (Fulka *et al.*, 1998).

### **2.6.3. Ovocito metafase II.**

Los ovocitos metafase II o preovulatorios. Conectado al ovocito por el huso mitótico formado por un puente citoplasmático, encontramos el primer corpúsculo polar, que contiene gránulos corticales debido a su extrusión antes de la penetración de un espermatozoide y liberación de los gránulos corticales. El ovocito MII está generalmente asociado con un cúmulo expandido y una corona radiada clara (Harris *et al.*, 2007).

## **2.7. Ovulación.**

El pico preovulatorio de LH inducido por el estradiol, producido por los folículos, desencadena finalmente la ovulación. La hormona LH también estimula la leutinización de las células de la pared de los folículos ovulados, es decir su transformación de productoras de estrógenos a productoras de progesteronas, que será la principal hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación (Geisert, 1999).

Los ratones alcanzan la madurez sexual a las 6 semanas de edad, dependiendo de la raza y de las condiciones ambientales. En este momento cada ovario contiene aproximadamente 10,000 ovocitos de diferentes estadios de maduración. La ovulación requiere la respuesta coordinada de las células foliculares como del ovocito y bajo condiciones óptimas ocurre espontáneamente cada 4 días (Foster *et al.*, 1981).

En una ovulación natural, dependiendo de la raza, se liberan entre 8 – 12 ovocitos pero el proceso no es sincrónico y ocurre en un periodo de 2 – 3 horas (Nagy *et al.*, 2003).

### **2.8. Tamaño y forma de los ovocitos.**

El diámetro medio de los ovocitos MII puede variar sustancialmente, pero no está relacionado con la fertilización o calidad del desarrollo de los embriones en la etapa de desarrollo de la división celular (Romão *et al.*, 2010). La situación es diferente con ovocitos gigantes (Balakier *et al.*, 2010). Este tipo de ovocito tiene aproximadamente el doble de volumen que un ovocito normal (aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ ) y es tetraploide antes de la meiosis debido a su origen.

### **2.9. Superovulación.**

La superovulación es una técnica que consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos, en un momento previamente fijo (Gorlach., 1999) teniendo como objetivo principal producir un gran número de ovocitos que resulten de una alta calidad. Sin embargo, la respuesta de estos estímulos es variable, en cuanto a cantidad y calidad de ovocitos recuperados provenientes de dicho estímulo (Mapletoft *et al.*, 1994).

### **2.10. Ácido linoleico conjugado.**

El ácido linoleico conjugado (CLA), término para un grupo de ácidos grasos de 18 carbonos con un doble enlace conjugado. Se ha demostrado que influye en una gama de procesos biológicos, que presenta propiedades anti cancerígena (cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12) (Kelley *et al.*, 2007), hipoglucemiante (cis-9, trans-11y trans-10, cis-12) y antilipogénica (trans-10, cis-12) (Evans *et al.*, 2002). Las investigaciones con animales de laboratorio (Park *et al.*, 1997), ovinos (Ivan *et al.*, 2001), bovinos productores de carne (Gillis *et al.*, 2007) y bovinos lecheros (Hutchinson *et al.*, 2011, Choulinard *et al* 1999)), demostraron que la

adición de CLA mejora el comportamiento animal, reduce el tejido adiposo y altera el metabolismo de lípidos. Los mecanismos mediante los cuales se producen dichas transformaciones no son completamente entendidos.

(Ivan *et al.*, 2001), indicaron que la adición de 2.70 % de CLA, de aceite de girasol en la dieta de ovinos, ocasionó una reducción masiva en la población de protozoarios del rumen, la reducción se asoció con el mejoramiento de ganancia diaria de peso, la eficiencia de conversión del alimento y el incremento de CLA. Específicamente el isómero (trans-10, cis-12) CLA., ha demostrado que altera la composición de lípidos de la membrana (Sampath *et al.*, 2005), para inhibir la síntesis de lípidos en diferentes animales.

La administración de suplementos *in vitro* en sistema de cultivo fue sugerido para mejorar la supervivencia de embriones bovinos (*Bos primigenius Taurus*) después de la criopreservación (Pereira *et al.*, 2007).

### **2.11. Mecanismo de acción de lípidos y su efecto en la actividad reproductiva.**

Los triglicéridos constituyen la mayor parte de los lípidos que se almacenan como depósitos grasos en el organismo, el resto se encuentra como fosfolípidos, ésteres de colesterol, diglicéridos, monoglicéridos y fracciones libres de AG. Representan el principal material de reserva energética (Lock *et al.*, 2005).

Los AG poliinsaturados de la dieta reducen los triglicéridos sanguíneos y el tamaño de las partículas de GL. Además, mejoran la sensibilidad a la insulina, y aumentan la utilización de glucosa no hepática en ratas (Houseknecht *et al.*, 2002). Cualquiera que sea la fuente, los AG pasan por un proceso de elongación y desaturación que genera AG con propiedades bioquímicas diferentes. La elongación involucra la adición de unidades de dos carbonos por acción de elongasa.

La desaturación es un proceso catalizado por las enzimas desaturasas que insertan una doble ligadura en la cadena de acilos (Schroeder *et al.*, 2004; Looor *et al.*, 2003). Las desaturasas se clasifican de acuerdo a la posición de la inserción de la doble ligadura.

El rango de posibles inserciones de enlaces dobles varía de acuerdo al organismo. Por ejemplo, el ácido linoleico es un ácido graso esencial requerido para la síntesis del ácido araquidónico y otros compuestos esteroidales (Beam *et al.*, 1999).

La grasa de la dieta favorece la actividad reproductiva mediante el suministro de energía (Sklan *et al.*, 1994). Por ejemplo, el incremento en la disponibilidad de los precursores de AG permite el aumento en la secreción de esteroides y prostaglandinas, los cuales pueden alterar las funciones del útero y ovario. A nivel celular, los AG tiene efectos diferentes en la transcripción de genes que codifican proteínas esenciales en los eventos reproductivos. Algunos AG derivados del proceso de bio-hidrogenación como los isómeros trans-10, cis-11 y cis-9, trans-11 han demostrado que incrementan la cantidad de AG insaturados que alcanzan el tracto gastrointestinal bajo de los rumiantes y se incorporan en tejido adiposo y en leche (Lock *et al.*, 2005).

## **2.12. Efecto benéfico del ácido linóleo conjugado sobre la calidad ovocitaria.**

El CLA ha llamado mucho el interés en las últimas dos décadas, desde su actividad anticancerígena (Ip *c.*, 1997), hasta su aplicación en la producción de embriones *in vitro* (Funston R., 2004). Sin embargo, poco se sabe cómo esta mezcla de compuestos tiene efectos benéficos sobre la calidad ovocitaria y embrionaria. Un análisis del líquido folicular de ovejas de pelo alimentadas con aceite de maíz muestra la presencia de isómeros de CLA y una mayor calidad de ovocitos, dicha calidad puede estar medida por la presencia de CLA en el ambiente folicular (Meza *et al.*, 2014). El cual pudiera poseer una capacidad atrapante de radicales libres, ya que CLA se considera como un efecto inhibidor del estrés oxidativo cuando se le compara con los tocoferoles y antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) (Yu L., 2001).

La adición de CLA al medio de cultivo de embriones ha demostrado disminuir la deposición citoplasmática de lípidos en el embrión, mejorando significativamente la resistencia de los embriones para la micromanipulación, criopreservación y aumenta su supervivencia después de la misma (Pereira *et al.*, 2007).

Los efectos secundarios de CLA se pueden evaluar mediante el análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés celular, apoptosis y calidad ovocitaria, a través de peroxiredoxin (PRDX), proteína de choque térmico (HSPB1) (Wood *et al.*, 2003), marcadores de apoptosis celular (BAX / BCL2) (Yang y Rajamahndran, 2002) y calidad ovocitaria (OCT-4, MATER y folistatina). El factor de transcripción OCT-4 es expresado en células germinales primordiales, espermatogonias no diferenciadas, durante el desarrollo embrionario se expresa en blastómeros y en la masa celular interna (ICM) y en células madres embrionarias derivadas de la (ICM) (Zuccotti *et al.*, 2009).

La expresión de la OCT-4 en ovocitos indica que los folículos en cada estadio del crecimiento folicular entran a una vía que permite la adquisición de un total desarrollo competente precedido al estado de maduración; en contraste los ovocitos que no expresan OCT-4 pueden ser eliminados durante la foliculogénesis.

### **2.13. Identificación de lípidos en ovocitos.**

Existen diferentes técnicas para la cuantificación de lípidos pero estas requieren de 4 a 1000 ovocitos o embriones para su análisis (Kim *et al.*, 2001). También es posible medir el contenido de lípidos mediante un ensayo enzimático acoplado a la detección de microfluorescencia (Ferguson *et al.*, 1999). Esta técnica es más sensible, pero es difícil de realizar y con la ayuda de microscopía electrónica de fluorescencia, se puede evaluar el número, la densidad y el tamaño de la gotitas de lípidos intracelulares.

Por lo tanto se utilizará un colorante fluorescente específico para lípidos, rojo de nilo, para visualizar las gotitas de lípidos y evaluar el contenido de lípidos en ovocitos individuales, cuantas más gotas estén presentes en un ovocito, mayor será la cantidad de luz fluorescente emitida después de la tinción (Than *et al.*, 2003). Para permitir la evaluación del contenido de lípidos en ovocitos individuales o embriones, la fluorescencia se cuantifico utilizando un fotómetro conectado a un microscopio.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El ácido linoleico conjugado es un ácido graso natural y se ha demostrado que influye en una gama de procesos biológicos, que presentan propiedades anti-cancerígenas, antilipogénica y que altera la composición de los lípidos en diferentes animales, para regular la expresión de genes implicados en el novo. Además la administración de CLA en la dieta diaria en ratones hembra mejorará la calidad ovacitaria, aumentara el número de ovocitos recuperados y disminuirá la concentración de triglicéridos (gotas lipídicas) en los ovocitos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La adición del ácido linoleico conjugado a dietas para ratones hembra de la cepa CD-1 modifica los patrones de acumulación lipídica de la membrana plasmática de ovocitos y afecta positivamente su calidad.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo principal**

Evaluar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad y la acumulación de lípidos en la membrana plasmática de ovocitos en ratones hembra de la cepa CD-1.

### **5.2. Objetivos secundarios**

- Determinar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la calidad de ovocitos en ratones hembra de la cepa CD-1
- Evaluar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la concentración de gotas lipídicas en la membrana plasmática de ovocitos en ratones hembra de la cepa CD-1.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Ubicación.**

El presente experimento se realizó en el laboratorio de Biotecnología animal perteneciente, a la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, la cual se localiza en el Circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial C.P. 68301

### **6.2. Animales y Alimentación.**

Se emplearon 10 ratonas de la cepa CD-1, con un peso vivo (PV) de  $35 \pm 5$  g y  $65 \pm 8$  días de edad al inicio del experimento las cuales fueron distribuidas en dos tratamientos: TCON: (n=5) y TCLA (n=5), ambos grupos recibieron 15 g diarios de alimento comercial (NUTRI-CUBOS®) por la mañana, agua ad libitum, el grupo TCLA recibieron 1.5 g (5% PV) de CLA durante la fase experimental (21 días) vía oral.

### **6.3. Superovulación, obtención y evaluación ovocitaria.**

El día 21 del tratamiento las hembras recibieron 5 UI de Gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG: SINCROPART™) vía intraperitoneal, 48 h post a la aplicación de PMSG recibieron 5 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG: Choragon®), 15 h posteriores a la aplicación de la HCG las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical de acuerdo a la figura 2. Post sacrificio de las hembras, los tractos reproductivos fueron localizados, recuperados y colocados en suero fisiológico atemperado a 37 °C para la localización del ámpula y la extracción de los cúmulus, 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: Cúmulus compacto (> 4ª 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 cúmulus compacto (ligeramente ampliados cúmulus) con ooplasma irregulares que contiene grupos oscuros.
- 4- Mala: Ovocitos desnudos y ooplasma irregulares.

La extracción de los ovocitos se realizaron con la ayuda de un estereoscopio (Nikon SMZ800N Zoom stereomicrope) y pipeta Pasteur alargada. Con la ayuda de un vórtex se eliminan las células foliculares que rodean al ovocito formando el cúmulo, con el fin de seleccionar los ovocitos maduros que presentan un claro corpúsculo polar (Nagary, 2003).

#### **6.4. Tinción de ovocitos con Rojo de Nilo.**

Previo a la tinción, los ovocitos se desnudaron mediante agitación con un vórtex por 5 min con el propósito de eliminar las células del cúmulus, una vez desnudados los ovocitos se fijaron en un porta objeto con 500 µL de glutaraldehido al 2% y solución de formaldehido al 2% durante al menos 24 h en completa oscuridad. Posteriormente se le adicionaron 30 µL de solución Rojo de Nilo (10 µg/mL 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.

#### **6.5. Evaluación y cuantificación gotas lipídicas por fluorescencia.**

Las gotas lipídicas fueron cuantificadas con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS) con el objetivo de 40X (excitación 400-500 nm y una emisión de 515 LP). Las imágenes fueron capturadas por separado utilizando filtros monocromáticos para FITC con una cámara (Evolución™Mp Color) acoplada al sistema de microscopia, la cuantificación de la

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

El análisis estadístico para la cuantificación de luz de fluorescencia se realizó con la ayuda del software QUANTIPORO personalizado (IMAGEJ) y se realizó una prueba anova para verificar resultados. Las unidades se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Número total y calidad ovocitaria

El número total y calidad de ovocitos obtenidos de ratones hembra de la cepa CD-1 alimentadas con CLA se presentan en el cuadro 1. Se observa un incremento del 25% ( $P \leq 0.05$ ) de ovocitos recuperados a favor del grupo alimentado con CLA en comparación al grupo control. En cuanto a la calidad ovocitaria el grupo alimentado con CLA presenta un 63% de ovocitos de excelente y buena calidad contra un 37% del grupo control. En cuanto a ovocitos de regular y mala calidad el grupo control presenta un mayor porcentaje (63%) en comparación con el grupo tratado (37%).

El número de ovocitos recuperados presenta un efecto favorable de la suplementación de CLA sobre esta variable. No obstante, los resultados que soporten esta evidencia en modelos murinos son escasos; sin embargo, existen diversos 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 (Kim *et al.*, 2000; McEvoy *et al.*, 2012; Meza *et al.*, 2013) en algunas especies de rumiantes (Ovinos y Bovinos).

Los resultados en el presente estudio muestran un efecto favorable del CLA sobre la calidad ovocitaria, se ha reportado que los componentes de la dieta tienen influencia sobre el desarrollo folicular y la composición del Líquido folicular (LF), ya que estos una vez que son metabolizados por el sistema digestivo son integrados al torrente sanguíneo y transportados al LF (Jenkins, 2004; Aardema, 2014) e impactando la calidad ovocitaria (Meza *et al.*, 2014).

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), ya que estos pueden 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 ácidos grasos libres (Jungheim *et al.*, 2011), con los cuales las células del cumulus tienen contacto directo, siendo la única barrera existente entre el fluido folicular 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 alrededor (Aardema *et al.*, 2013).

Aardema *et al.*, en 2013 informan que 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.

Sin embargo, una acumulación excesiva de ácidos grasos provoca hiperlipidemia reduciendo su desarrollo a estadios embrionarios avanzados (Leroy *et al.*, 2010) debido a que aumentan su vulnerabilidad al estrés oxidativo. Durante su crecimiento y maduración, el metabolismo energético se acelera e incrementa la presencia de especies reactivas al oxígeno (Valco *et al.*, 2007).

En este sentido, la presencia de CLA (cis-9, trans-11 y trans-10, covacitariais-12) en líquido folicular pudiera poseer una capacidad atrapante de radicales libres (Dinara *et al.*, 2000; Banni *et al.*, 1998; Yu., 2001) inhibiendo su efecto y favoreciendo la calidad ovocitaria *in vivo* (Meza *et al.*, 2013, 2014).

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

| Tratamiento | Calidad          |                  |                  |                  | 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 hileras presentan diferencias significativas entre calidad, **ABC:** literales entre columnas representan diferencia significativa entre tratamientos. **TCLA:** Tratamiento con CLA, **TCON:** Tratamiento Control.

## 7.2. Cuantificación de lípidos

El resultado de la intensidad de fluorescencia del grupo control y tratado con CLA se muestra en la figura 3. Los ovocitos de ratonas que consumieron CLA presentan menos gotas lipídicas expresadas (figura 4) en unidades de fluorescencia ( $145.8 \pm 17.8$ ) emitida en comparación grupo control ( $246 \pm 13.1$ ).

En el cuadro 2, se presentan las unidades de fluorescencia emitida por los ovocitos en cuanto a su calidad, se observa que conforme la calidad ovocitaria decrece los lípidos presentes en el ovocito son menores ( $P \leq 0.05$ ). Sin embargo, al comparar la cantidad de

lípidos presentes en la calidad ovocitaria por tratamiento, los ovocitos del grupo TCON presentan mayor ( $P \leq 0.05$ ) cantidad de lípidos.

Estos resultados concuerdan a los datos reportados 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 % en ovocitos de excelente calidad, mejorando su resistencia y tolerancia a la manipulación, aumentando sus probabilidades del ovocito para convertirse en embriones de mejor calidad y disminuyendo la deposición citoplasmática de lípidos en el ovocito (Pereira *et al.*, 2007).

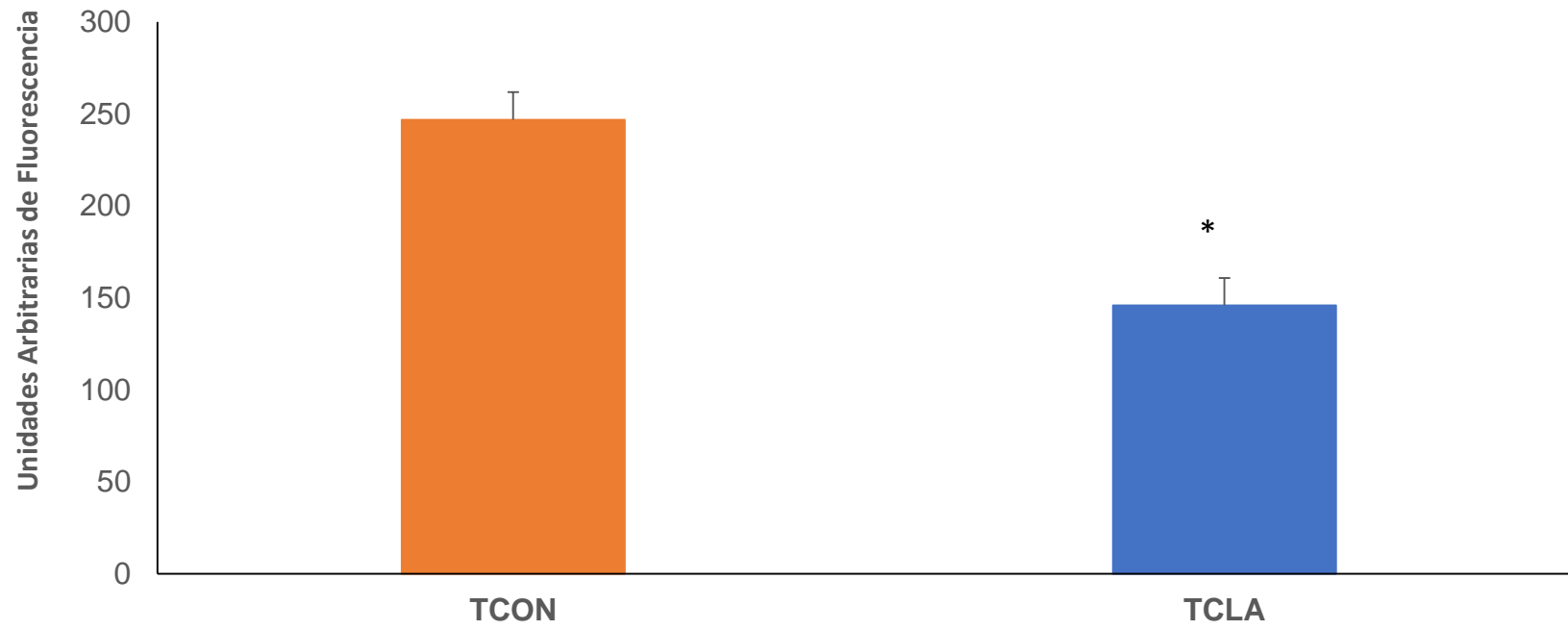
Además el ácido linoleico conjugado tiene un efecto positivo en el desarrollo folicular, dando lugar al aumento del número de folículos y ovocitos en el ovario Zeron *et al.*, 2002; Meza *et al.*, 2014.

Los lípidos intracelulares en los ovocitos se almacenan principalmente en gotas lipídicas (GL) que proporcionan energía, a través de la  $\beta$ -oxidación (Paczkowski *et al.*, 2013), para un crecimiento y desarrollo adecuado, son 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).

A nivel celular, son incorporados en la membrana celular en forma de GL, las cuales son sintetizadas en el citoplasma, se originan de los ácidos grasos extracelulares (provenientes de la circulación sanguínea) o de los sintetizados "*de novo*" (Aardema, 2014).

Las GL son orgánulos presentes en casi todas las células, el tamaño y número varía entre tipos celulares y dentro de un mismo tipo, dependiendo del estado de activación de las células (Bozzo *et al.*, 1996 ) o como resultado de una especialización celular, lo que probablemente constituye un mecanismo para reducir la lipotoxicidad (Welte, 2015), la alta proporción de GL se han asociado con efectos deletéreos en diferentes procesos del

desarrollo embrionario y la baja criotolerancia, (Sánchez., *et al.*, 2014). Por lo que diferentes estrategias se han evaluado para disminuir las gotas lipídicas en ovocitos y embriones (Ghanem *et al.*, 2014).

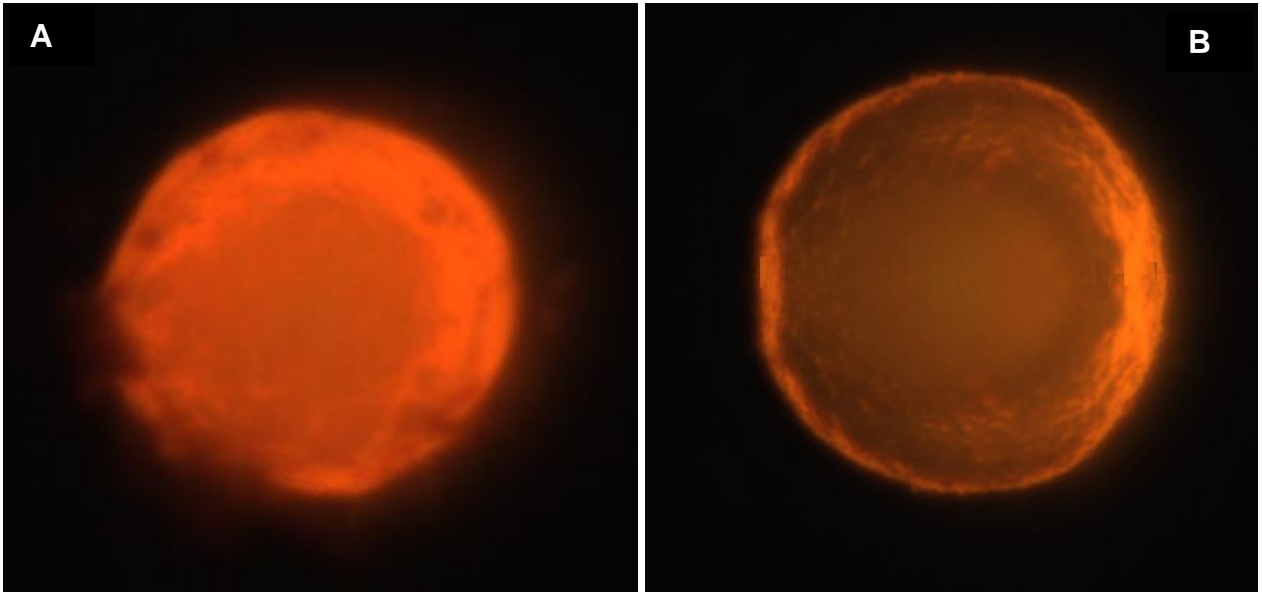


**Figura 2. Efecto del CLA en la acumulación de gotas lipídicas.** Unidades arbitrarias de fluorescencia en ovocitos de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA. (\*) indica diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

**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                      |                              |                              |                              |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|             | Excelente                    | Buena                        | Regular                      | Mala                         |
| <b>TCLA</b> | 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> |
| <b>TCON</b> | 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 hileras presentan diferencias significativas entre calidad, **ABC:** literales entre columnas representan diferencia significativa entre tratamientos. **TCLA:** Tratamiento con CLA, **TCON:** Tratamiento Control.



**Figura 3. Contenido de lípidos en ovocitos obtenidos de ratonas de la cepa CD-1 alimentadas con CLA. (A). ovocito del grupo control, (B) Ovocito del grupo tratado.**

## **8. Conclusión**

La adición de ácido linoleico conjugado en la dieta de ratones hembra de la cepa CD-1 favorece el número y calidad de ovocitos recuperados, y disminuye la acumulación de gotas lípidicas en la membrana plasmática de los mismos.

## 9. Bibliografía

1. Aardema, H., Lolicato, F., Van de Lest, C. H., Brouwers, J. F., Vaandrager, A. B., Van Tol, H. T., Roelen, B. A., Vos, P.L., Helms, J. B., & Gadella, B.M. (2013). Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Reprod*, 6, 1–15.
2. Aardema, H. (2014). Impact of free fatty acid composition on oocyte developmental competence in dairy cows. *Faculty of Veterinary Medicine*, 94: 618-637.
3. Apa, R., Lanzone, A., Miceli, F., Mastrandrea, M., Caruso, A., Mancuso, S., & Canipari, R., (1944). Growth hormone induces in vitro maturation of follicle and cumulus enclosed rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 106, 207-212.
4. Badajoz. (2010). Implicación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> regulada por depósitos intracelulares en la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup> en ovocitos de ratón. *Departemento de biología molecular y genética*, 3, 159-160.
5. Balakier, H., Bouman, D., Sojecki, A., Librach, C., & Squire, J.A. (2010). Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*, 17, 2394-2401.
6. Banni, S., Angioni, E., Contini, M., Carta, G., Casu, V., Lengo, G., Melis, P., Deiana, M., Dessi, A., & Corongiu, F. (1998). Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J. Am Oil Chem Soc*, 75, 261-267.

7. Bauman, D. E., Perfield, J. W., Harvatine, K. J., & Baumgard, L. H. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *Nature*, 138: 403-409.
8. Beam, S. W., & Butler, R. W. (1999). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Reproduction Fertility*, 54, 411-424.
9. Bozzo, M. G., Poquet, M., & Durfort, M. (1996). Ultraestructura de los oocitos maduros de *Tapes decussatus* (Bivalvia). (Estudio preliminar). *Iberus*, 179-88.
10. Choulinard, P. Y., Bauman, D. E., Corl, B. A., Baumgard, L.H., McGuire, M.A., & Giesy, J. G. (1999). An update on conjugated linoleic acid. *Department of Animal Science*, Cornell University, 93-101.
11. Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Developmental Biology*, 305, 300-11.
12. Dinara, S., Sengoku, K., Tamate, K., Harikana, M., & Ishikawa, M. (2000). Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod*, 16, 1976- 1981.
13. Evans, M., Brown, J., & McIntosh, M. (2002). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 508-516.
14. Ferguson, E., & Leese, H. (1999). Contenido de triglicéridos de ovocitos bovinos y embriones tempranos. *Journal Reproduction Fertility and Development*, 116, 373-8.

15. Foster, H. L., SMALL, J. D., FOX, J. G. (1981). The Mouse in Biomedical Research, Academic Press, 1: 221-228
16. Funston, R. N. (2004). Fat supplementation and reproduction in beef females. *Animal Science*, 82: 154-161.
17. Fulka, JR., First, N. L., MOOR, R. M. (1998). Nuclear y cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Hum Reprod*, 41:41-49.
18. Ghanem, N., Ha, A. N., Fakruzzaman, M., Bang, J., Lee, Sang-Chan., & Kong, I. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, 82: 238–250.
19. Geisert, R. D. (1999). Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, 792-799
20. Gillis, H. M., Duckett, S. K., & Sackmann, J. R. (2007). Effects of supplemental rumen protected conjugated linoleic acid or corn oil on lipid content and palatability in beef cattle. *Animal Science*, 85, 1504-1510.
21. Gilula, N., Epstein, M., & Beer, W. (1978). Cell-to-cell comunicacion and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *Cell Biology*, 78, 58-75.
22. Gorch, A. (1999). Transferencia de embriones en el ganado Vacuno. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España, 14, 16-18.
23. Harris, G., Marragos, P., & Carrol, J. (2007). Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental Biology*, 305, 44-133.

24. Houseknecht, K. L., Cole, B. M., & Steele, P. J. (2002). Peroxisome, proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) and its ligands: a review. *Domestic Animal Endocrinology*, 22, 1-23.
25. Hunter, M. G. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5, 30-120.
26. Hutchinson, I., De Veth, M. J., Stanton, C., Dewhurst, R. J., Lonergan, P., & Evans, A. C. O., Butler, S. T. (2011). Effect of lipid-encapsulated conjugated linoleic acid supplementation on milk production, bioenergetic status and indicators of reproductive performance in lactating dairy cows. *Dairy Research*, 78, 308-317.
27. Ip C. (1997). Review of the effects of trans fatty acid, oelic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Nature*, 66: 1523-1529.
28. Ivan, M., Mir, P. S., Koenig, K. M., Rode, L. M., Neil, L., Entz, T., & Mir, Z. (2001). Effects of dietary sunflower oil in rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research*, 41: 215-227.
29. Jenkins, T. (2004). Challenges of meeting cow demands for omega fatty acids. Florida Ruminant Nutrition Symposium. In: 15th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. *Department of Animal Sciences*. University of Florida, 52-66.
30. Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., & Mosley, E. E. (2008). Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Animal Science*, 86, 399-412.

31. Jungheim, E. S., Macones, G. A., Odem, R. R., Patterson, B. W., Lanzendorf, S. E., Ratts, V. S., & Moley, K. H. (2011). Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 95, 1970-1974.
32. Kelley, N. S., Hubbard, N. E., & Erickson K. L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 137, 2599-2607.
33. Kim, J. Y., 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.
34. Kim, N. H., Funahashi, H., Abeydeera, L. R., Moon, S. J., Prather, R. S. & Day, B. N. (2000). Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Journal Reproduction, Fertility and Development*, 107, 79-86.
35. Lapa, M., Marquez, C. C., Alves, S. P., Vasques, M. I., Baptista, M. C., Carvalhais, I., & Pereira, R. M. (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.
36. Leroy, M. R., Hoeck, V. V., Clemente, M., Rizos, D., Gutierrez, A. A., Soom, V. A., Uytterhoeven, M., & Bols, P. E. (2010). The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. *Hum Reprod*, 25(3): 768-778.
37. Lock, A. L., Bauman, D. E., & Garnsworthy, P. C. (2005). Effect of production variables on the cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content of cow's milk. *Dairy Science*, 88, 2714-2717.

38. Loor, J. J., & Herbein, J. H. (2003). Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous trans-10, cis-12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. *Dairy Science*, 86:1354-1369.
39. Mapletoft, R. J., Bo, G. A., & Campo, M. R. (1994). Factores que afectan la superovulación en la vaca. Consideraciones prácticas. *Bovis*, (58): 31-49.
40. Marei, W., Wathe, D., & Fouladi-Nashta, A. (2010). Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction fertility*, 139: 979-988.
41. McEvoy, T. G., Onal, A. G., Speake, B. K., & Robinson, J. J. (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.
42. McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke L. O'Connell, A., Smith, P., Groome N., & Tisdall, D. D. 1999. Control of early ovarian follicular development. *Reproduction Fertility*, 54: 3-16.
43. Mehlmann, L. M. (2005). Stops and stars in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130, 791-799.
44. Meza, Villalvaso, V., Magaña, S. H., Sandoval, C. C., & Chay-Canul, A. (2013). Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre población folicular y calidad ovocitaria en ovejas Pelibuey. *Nova Scientia*, 12, 287-303.

45. Meza, Villalvaso, V., Trejo, C. A., Magaña, S. H., Sandoval, C. C., Chay-Canul, A., & Cavazos, G. A. (2014). Perfil metabólico de isómeros de Ácido Linoleico Conjugado y calidad de ovocitos en ovejas de pelo. *Nova Scientia*, 12 (2): 287-303.
46. Moore K.L., Persaud Embriología clínica. T.V.N, 2009
47. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintertem, K., & Behringer, R. (2003). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York Jhon Inglis.
48. 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. *Biol Reprod*, 88, 1–11.
49. Pan, H., O'Brien, M. J., Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. 2005. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Developmental Biology*, 283: 493-506.
50. Park, Y., Albright, K. J., Liu, W., Storkson, J. M., Cook, M. E., & Pariza, M. W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Department of Food Microbiology and Toxicology*, University of Wisconsin-Madison, 32, 853-858
51. Pereira, R. M., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Horta, A. E., Portuga, P. V., Bessa, R. J., Chagas, E., Silva, J., Pereira, M. S., & Marques, C. C. (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.
52. Picton H, Harris S, Muruvi W, & Chambers, E. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 136: 15-703.

53. Prates, E. G., Nunes, J., & Pereira, R. (2014). A Role of Lipid Metabolism during Cumulus Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production. *A Review Article*, 94: 554-702.
54. Richards, J. S., (2002). Delivery of the oocyte from the follicle to the oviduct: a time of vulnerability. *Ernest Schering Res Found Workshop*; 41: 43-62.
55. Romão, G. S., Araújo, M. C., De Melo, A. S., De Albuquerque. S. N. P. A., Ferriani, R. A., & Dos Reis, R. M. (2010). Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril*, 93, 621-625.
56. Sampath, H., & Ntambi, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes if lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 25, 317-340.
57. Sanchez-Lazo, L., Brisard, D., Elis, S., Maillard, V., Uzbekov, R., Labas, V., & Desmarchais, A. (2014). Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Molecular Endocrinology*, 28, 1502-1521. doi: 10.1210/me.2014-1049
58. Santos, J. P. G., Bilby, T. R., Thatcher, W. W., Staples, C. R., Silvestre, F. T. (2008). Long chain fatty acids of diets factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 23-30.
59. Schroeder, G. F., Gagliostro, G. A., Bargo, F., Delahoy, J. E., & Muller, L. D. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: A Review. *Livestock Production Science*, 86, 1-18.
60. Sklan, D., Kaim, M., Moallen, U., & Folman, Y. (1994). Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first and older cows. *Dairy Science*, 77, 1652-1663.

61. Sun, Q. Y., Miao, Y. L., & Schatten, H. (2009). Towards a new understanding. On the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Biol reprod*, 8: 274-7.
62. Than, N. G., Sumegi, B., Bellyei, S., Berki, T., Szekeres, G., & Janaky, T. (2003). Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells. *European Journal of Biochemistry*. 270, 1176–88.
63. Tornell, J., Billig, H., & Hillensjo, T. (1990). Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Department of Physiology*, 139, 511-7
64. Valco, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
65. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 39: 44-84.
66. Welte, M. A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Department of Biology*, 25, 470–481.
67. Yu, L. (2001). Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3452-3456.
68. 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.

69. Zuccotti, M., Merico, V., Sacchi, L., Bellone, M., Brink, T. C., & Stefanelli, M. (2009). OCT-4 regulates expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes. *Human Reproduction*, 24, 2225-2237.