

Influencia de la suplementación del medio de cultivo con ácido linoleico en la supervivencia a la congelación de embriones bovinos in Vitro

Año
2017

Autores

Bernal Ballesteros, Beatriz H.; Tribulo, Humberto
E.; Mutto, Adrián A. y Almicar Bo, Gabriel

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Bernal Ballesteros, B., [et al]. (2017). *Influencia de la suplementación del medio de cultivo con ácido linoleico en la supervivencia a la congelación de embriones bovinos in Vitro* . Málaga, España: REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 18 (11), 1-11.



Influencia de la suplementación del medio de cultivo con ácido linoleico en la supervivencia a la congelación de embriones bovinos *in Vitro* - Influence of culture medium supplementation with linoleic acid on survival to cryopreservation of *in vitro* bovine embryos

Beatriz H Bernal Ballesteros^{1,2}, Ing. Quim., MSc; **Humberto E Tribulo**¹, MV, PhD; **Adrián A Mutto**³, Bio, PhD; **Gabriel Almicar Bo**^{1,4}, MV, PhD.

¹ Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina.

² Vitrogen Colombia S.A.S, Bogotá, Colombia.

³ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, IIB-INTECH Dr. Rodolfo Ugalde, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina.

⁴ Instituto de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Argentina.

Corresponding author: bhbernalb@yahoo.es

Resumen

Estudios reportan que la adición de ácido linoleico en los medios de producción de embriones bovinos *in vitro*, mejora su resistencia a la congelación convencional. En este estudio se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones bovinos *in vitro* a la congelación, mediante la adición de ácido linoleico (LA) en el medio de cultivo los días 3 o 5. Un total de 1452 oocitos fueron recuperados y asignados a 4 grupos experimentales y un grupo control. Se realizaron seis réplicas, para obtener aproximadamente 100 embriones congelables por grupo. Grupo 1: 100 μ M en Día 3, grupo 2: 50 μ M en Día 3, grupo 3: 100 μ M en Día 5, grupo 4: 50 μ M en Día 5. Los embriones se congelaron y a la semana fueron descongelados para evaluar los porcentajes de re-expansión (24 h) y de eclosión (72 h). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y cuando las diferencias fueron significativas, se compararon las medias entre los grupos por el Test LSD de Fischer ($p < 0.05$). Se observó que el porcentaje de re-expansión mejoró significativamente con la adición de 50 μ M de LA en el Día 5 (54.94 ± 28.8 vs. 19.19 ± 28.4 , $p = 0.001$) y el porcentaje de eclosión con la adición de 50 μ M de LA en el Día 3 (37.9 ± 18.3 vs. 9.02 ± 12.0 , $p = 0.014$), cuando se comparó con el grupo control. En conclusión, la adición de ácido linoleico mejora la supervivencia a la congelación de los embriones bovinos producidos mediante técnicas *in vitro*.

Palabras clave: *embriones, in vitro, cultivo, ácido linoleico.*

Abstract

Studies report that the addition of linoleic acid to bovine embryo production media in vitro improves its resistance to conventional freezing. In this study the effect on survival of in vitro bovine embryos under freezing was evaluated by the addition of linoleic acid (LA) in the culture medium on days 3 or 5. A total of 1452 oocytes were recovered and assigned to 4 experimental groups and a control group. Six replicates were made to obtain approximately 100 freeze-thawed embryos per group. Group 1: 100 μ M on Day 3, group 2: 50 μ M on Day 3, group 3: 100 μ M on Day 5, group 4: 50 μ M on Day 5. The embryos were frozen and one week after they were thawed to evaluate the percentages of re-expansion (24 h) and hatching (72 h). The results were analyzed by ANOVA and when the differences were significant, the means between the groups were compared by Fischer's LSD Test ($p < 0.05$). It was observed that the percentage of re-expansion was significantly improved with the addition of 50 μ M LA on Day 5 (54.94 ± 28.8 vs. 19.19 ± 28.4 , $p = 0.001$) and the percentage of hatching with the addition of 50 μ M of LA at day 3 (37.9 ± 18.3 vs. 9.02 ± 12.0 , $p = 0.014$), when they were compared with the control group. In conclusion, the addition of linoleic acid improves the survival to freezing of bovine embryos produced by in vitro techniques.

Key words: *embryos, in vitro, culture, linoleic acid*

Introducción

Los fosfolípidos son moléculas de características anfipáticas que forman parte de las membranas celulares, favoreciendo las funciones biológicas en el crecimiento, maduración y funcionamiento de las células (Tamargo-Santos et al., 2011).

Los ácidos grasos y el colesterol son esenciales en la síntesis de hormonas como: estrógenos, progesterona y prostaglandinas, influyendo en el desarrollo ovárico al incrementar el número o diámetro de los folículos (Piccinato et al., 2010; Jahanian et al., 2013). Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados son susceptibles al estrés oxidativo, produciéndose la peroxidación lipídica, que ocasiona pérdida de fluidez y funciones de las membranas, inactivación de receptores y enzimas unidas a membranas, aumento de la permeabilidad iónica y ocasionalmente ruptura de membrana y muerte celular (Gutteridge, 1995).

El LA es un ácido graso poli-insaturado y esencial de la serie omega 6, cuya fórmula molecular es $C_{18}H_{32}O_2$. Es el ácido graso insaturado más abundante en

el fluido folicular (Zeron et al., 2002) y se ha empleado como aditivo crioprotector en embriones bovinos con efectos favorables (Imai et al., 1997).

Los CLA (Ácido linoleico conjugado) son un grupo de isómeros del ácido linoleico, han demostrado actividad antilipogénica, especialmente el trans-10, cis-12 (Evans et al., 2002). Son potentes inhibidores de la glucólisis y la lipogénesis de novo, a través de la regulación de los genes glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L-Piruvato quinasa (PK-L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al., 2005).

Los CLA se ha empleado en las dietas bovinas y en la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* Bovino, para mejorar la supervivencia embrionaria ya que altera la composición lipídica de la membrana celular, inhibiendo la síntesis lipídica y regulando la expresión de genes que involucran la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Bailey et al., 2015).

En estudios se ha reportado que el CLA adicionado al medio de cultivo (CIV), junto con antioxidantes como el Glutatión (GSH) y el β -mercaptoetanol, previno la oxidación de los ácidos grasos, disminuyó el diámetro de las gotas lipídicas y la deposición citoplasmática de lípidos e incrementó la calidad de los blastocitos y la supervivencia de los embriones después de la criopreservación (Pereira et al., 2007; Pereira et al, 2008).

En este estudio se hipotetizó que un medio de CIV de tipo secuencial al ser suplementado con ácido linoleico, incrementa la supervivencia a la congelación de los embriones bovinos producidos *in vitro*. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la adición de ácido linoleico en el medio de CIV de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados con etilenglicol (EG).

Materiales y métodos

Recuperación de oocitos y maduración in vitro (MIV)

Los complejos cúmulos-oocitos (COC) se obtuvieron de la punción de ovarios de frigorífico y fueron aspirados de folículos de 2 a 13 mm de diámetro empleando jeringas BD (Becton Dickison, USA) de 5 ml con agujas BD (19 G). El fluido folicular obtenido se colocó en tubos Falcon de 50 ml (Falcon, USA) y se dejó reposando hasta la visualización del pellet formado por los COC que decantaron, estos se extrajeron con pipeta pasteur (BRAND, USA) y se colocaron en placa de 90 mm (Delta Lab, España), para la búsqueda de los mismos con ayuda de lupa estereoscópica (Nikon SMZ645, Nikon, Japón). Se seleccionaron los COC grado I, II y III (Hasler et al., 1995), se lavaron en tres gotas de 100 μ M de medio TCM-199 Hank's (GIBCO, Life Technologies, Burlington, ON) suplementado con 2.5 mg/ml de piruvato de sodio, 50 μ g/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB: GIBCO, Life Technologies, Burlington, ON), el cual fue calentado previamente a 38.8 °C y luego en una gota de 100 μ M de medio MIV, el cual

fue preparado de la siguiente forma: medio TCM-199 con sales de Earl (GIBCO, Life Technologies, Burlington, ON), 10 μ l/ml de hormona foliculo-estimulante recombinante humana (FSH-rh, Gonal-f, Merck, USA.), 2.5 mg/ml de piruvato de sodio, 50 μ g/ml de gentamicina, 100 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 μ M de Cisteamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 1 % de suero fetal bovino (SFB, GIBCO, Life Technologies, Burlington, ON), equilibrado a 38.8 °C con una atmósfera de 5.5% CO₂.

Los COC obtenidos (n = 1452) fueron puestos a madurar en placas de petri de 35 mm (Corning ®, USA), mediante la metodología de micro-gota y cubiertas con aceite mineral, se colocaron 20 oocitos por gota de 90 μ l de medio MIV. Una vez colocados todos los oocitos en las respectivas gotas, las placas fueron puestas en incubadora a 38.8 °C y 5.5% de CO₂, el tiempo de maduración fue de 24 h.

Separación espermática y fertilización in vitro (FIV)

Para la fertilización de los ovocitos se empleó semen convencional de toros con fertilidad comprobada. Las pajuelas de 0.5 ml, se descongelaron 10 segundos al aire y 30 segundos en baño maría a 37 °C. Para su selección y capacitación se empleó el sistema de gradientes de minipercoll de densidad creciente (45%-90% v/v), cada columna con un volumen de 200 μ l, previamente calentado a 38.8 °C. El contenido de la pajuela se colocó en la parte superior del gradiente y se centrifugó a 4000 rpm durante 8 min. (Centrifuga Arcano 90-2, Arcano, Argentina), el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de IVF-SOF, previamente equilibrado a 38.8 °C y atmósfera de CO₂ al 5.5 % y se procedió a una segunda centrifugación a 1200 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante, dejando sólo el pellet formado.

Luego con el pellet formado se realizó el conteo de espermatozoides (Spz) en cámara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemania) para determinar la concentración espermática, mediante una dilución en agua de 1/20. Establecida la concentración se procedió a fertilizar los ovocitos con una dosis de 1.5×10^6 spz/ml.

Pasadas 24 h de maduración, los COC fueron lavados en tres gotas de 100 μ l de IVF-SOF y depositados en placas de cultivo de 35 mm (Corning, USA) en microgotas con un volumen de 50 μ l de IVF-SOF y cubiertas con aceite mineral. La co-incubación de los espermatozoides con los COC fue de 18-24 h a 38.8 °C y 5.5% de CO₂.

El medio de FIV (IVF-SOF) fue preparado con: NaCl: 315 mg, KCl: 26.8 mg, KH₂PO₄: 2 mg, NaHCO₃: 105 mg, Penicillin: 3.25 mg, C₃H₃O₃Na: 2.75 mg, BSA-FAF: 400 mg, C₆H₁₂O₆: 4.5 mg, CaCl₂. H₂O: 12.6 mg, C₃H₅O₃Na (Sirupe

60%): 23.5 µl, Heparina: 50 µg/ml y agua ultrapura cps: 50 ml; todos los reactivos empleados fueron Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Cultivo in vitro (CIV)

Pasadas las 18-24 h del proceso FIV, se procedió a desnudar mecánicamente los presuntos cigotos con micropipeta de 100 µl y se lavaron en cuatro gotas de 100 µl de medio SOF-Citrato, el cual fue preparado con: NaCl: 314,5 mg, KCl: 26,5 mg, KH₂PO₄: 8,1 mg, MgSO₄.7H₂O: 9,1 mg, NaHCO₃: 105 mg, Gentamicina: 2,5 mg, C₃H₃O₃Na: 4 mg, BSA-FAF: 150 mg, BME: 1,5 ml, MEM: 0,5 ml, C₅H₁₀N₂O₃: 2,5 mg, HEPES libre de ácido: 60 mg, C₆H₅Na₃O₇: 5 mg, Myo-inositol: 25 mg, HEPES Sal de Sodio: 65 mg, CaCl₂.H₂O: 13,1 mg, C₃H₅O₃Na (Sirope al 60%): 15 µl y Agua ultrapura cps: 50 ml, todos los reactivos empleados fueron Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El medio no se suplementó con SFB y fue previamente equilibrado a 38.8 °C y en atmósfera de 5.5 % CO₂ y 7% O₂.

Los presuntos cigotos se trabajaron en cuatro grupos experimentales y un grupo control. Se realizaron seis réplicas, para obtener aproximadamente 100 embriones congelables por grupo. **Grupo 1.** Adición de 100 µM de LA (L1012, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en el Día 3. **Grupo 2.** Adición de 50 µM de LA en el Día 3. **Grupo 3.** Adición de 100 µM de LA en el Día 5. **Grupo 4.** Adición de 50 µM de LA en el Día 5.

Las estructuras desnudadas se colocaron en placas de cultivo de 35 mm, en gotas de 90 µl de medio SOF-Citrato cubiertas con aceite mineral, de acuerdo a los grupos se realizó feeding (cambio del 50% de medio) con el medio correspondiente en los Días 3 o 5.

El porcentaje de clivaje (conteo de estructuras con división celular) se evaluó el Día 3, visualizando por medio de lupa estereoscópica la presencia de dos o más células. En el Día 7, la producción embrionaria fue evaluada, por observación de la cantidad de blastocitos.

Criopreservación de embriones

Los blastocitos grado I (Día 7 del CIV) fueron lavados en tres gotas de 100 µl de SOF-Citrato (para retirar el aceite proveniente de las placas de cultivo), se expusieron durante 5 min. en EG 1.5 M (Vigro Ethylene Glycol, Vetoquinol, USA) y se cargaron 10 embriones del mismo grupo, en pajuelas de 0.25 ml. Una vez las pajuelas estuvieron cargadas y selladas, se colocaron en una congeladora Freeze Control 5500 (Cryologic, Australia) a - 6.5 °C, pasados 2 min. se realizó el seeding (inducción de la cristalización), y luego de 10 minutos de estabilización se inició la curva de congelamiento a una velocidad de 0.6 °C /min. Al culminar la curva de congelamiento, es decir a los - 35 °C, las pajuelas se almacenaron en un termo con N₂ (nitrógeno) líquido por un tiempo mínimo de una semana.

Proceso de descongelado de embriones

Para evaluar la resistencia de los embriones a la criopreservación, se tomaron las pajuelas almacenadas en N₂ líquido; se descongelaron, dejándolas 10 segundos al aire y 20 segundos en baño maría a 37 °C. Los embriones descongelados se depositaron en una placa de Petri y luego fueron lavados con SOF-Citrato, posteriormente puestos en CIV en este mismo medio mediante la técnica de microgota. Finalmente se procedió a la evaluación de re-expansión a las 24 h y de eclosión a los 72 h.

Análisis estadístico

Los porcentajes de clivaje, producción de embriones, re-expansión y eclosión, fueron analizados mediante ANOVA y cuando las diferencias fueron significativas, se compararon las medias entre los grupos por el Test LSD de Fischer ($p < 0.05$). El análisis estadístico del experimento fue realizado utilizando el programa Stata MP – 64.

Resultados

En este estudio la adición de LA mostró una influencia positiva sobre el desarrollo embrionario de todos los grupos experimentales, al encontrarse diferencia significativa (Ver Gráfico No. 1). Siendo más favorable al ser adicionado en Día 3, en las concentraciones estudiadas, tanto en el porcentaje de clivaje como en el porcentaje de embriones. Los valores de p obtenidos (en Día 3), para los porcentajes de clivaje fueron: en concentración de 100 μ M (0.036) y en concentración de 50 μ M (0.022); para los porcentajes de embriones fueron: en concentración de 100 μ M (0.014) y en concentración de 50 μ M (0.034).

La adición de LA ejerció un efecto protector al aumentar numéricamente la cantidad de embriones re-expandidos y eclosionados con respecto al control, encontrándose diferencia significativa. El porcentaje de re-expansión fue mejor al emplear LA en Día 5 en concentración de 50 μ M ($p = 0.001$) y el porcentaje de eclosión en Día 3 en concentración de 50 μ M ($p = 0.014$) (Ver Gráfico No.2).

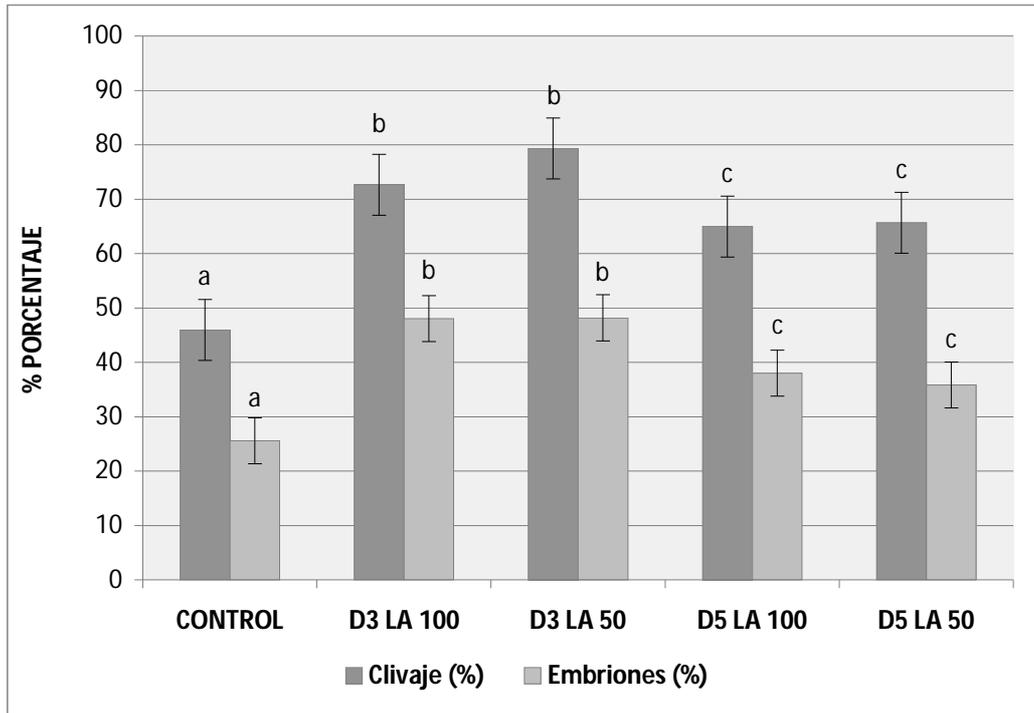


Gráfico No. 1. Producción de embriones con adición de LA en el medio CIV.

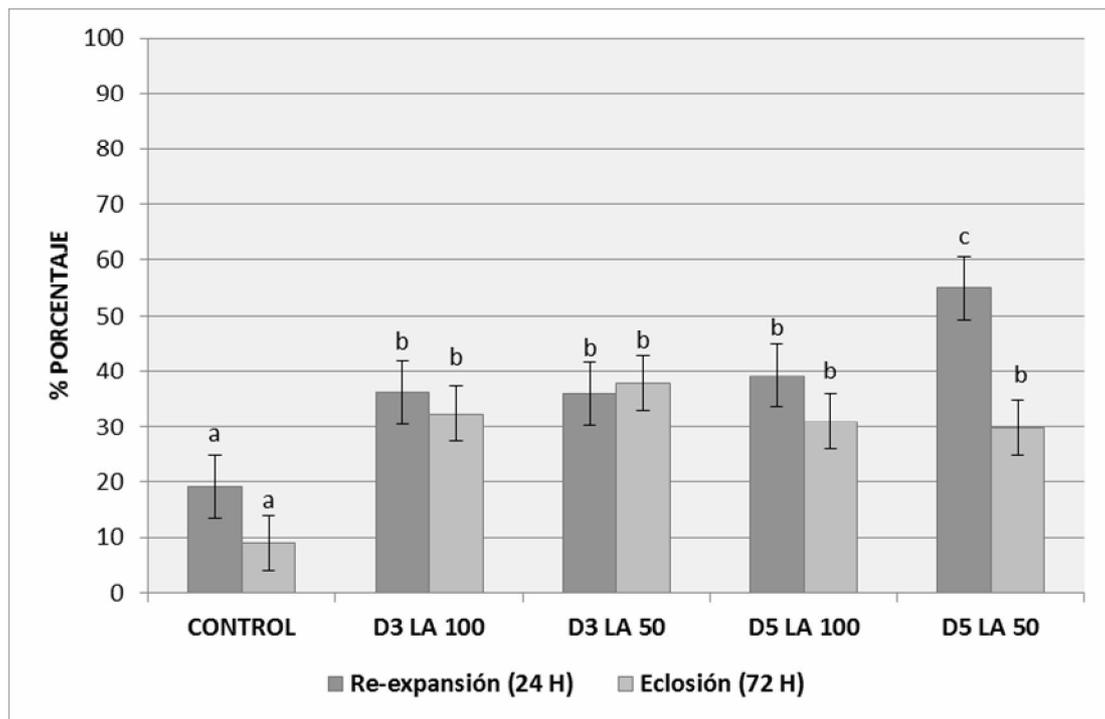


Gráfico No. 2. Sobrevida de embriones tratados en CIV con LA.

Discusión

En este estudio se aceptó la hipótesis planteada, un medio de CIV de tipo secuencial al ser suplementado con LA, incrementa la supervivencia a la congelación de los embriones bovinos producidos *in vitro*.

Imai et al., (1997), reportaron que el ácido linoleico-albumina (ALA) al ser empleado como aditivo crioprotector, presentó efectos favorables en la supervivencia de embriones bovinos después de congelación. Esto pudo ser atribuido al incremento en la fluidez de la membrana, debido a la incorporación directa del ALA en la bicapa lipídica y depleción del colesterol de membrana. Bailey et al., (2015) reportaron que la disminución en la criotolerancia de ovocitos y embriones se asoció con un mayor contenido de lípidos citoplasmáticos. Estudios previos en vacas han demostrado que la modificación nutricional inducida de los componentes foliculares, identificando al trans-10, cis-12 ácido linoleico conjugado (CLA) como un potente inhibidor de la síntesis de grasa en la leche en vacas lactantes y su inclusión en el medio de cultivo mejoró la supervivencia del embrión después de la descongelación (Bailey et al., 2015). Pereira et al., (2014) reportaron también sensibilidad al congelado de embriones de Bos Indicus y sus cruces, debido a la acumulación de lípidos neutros en el citoplasma. Además, informaron que el cultivo de cigotos en CR2aa (medio de Rosenkranks y First) con 100 m/L de CLA no tuvo efecto sobre las tasas de clivaje, producción embrionaria y en los niveles de genes m-RNA relacionados con el estrés celular y apoptosis. Pero si un aumento significativo en la tasa de re-expansión comparado con el control, más no en eclosión. La suplementación con CLA disminuyó el contenido de lípidos neutros al afectar la síntesis de triglicéridos mediante la reducción de la expresión génica de 1-acilglicerol, 3-fosfato o-aciltransferasa (AGPAT). Mientras que en este estudio el LA sí tuvo efectos sobre el clivaje y la producción embrionaria, hay que tener en cuenta que la calidad de los oocitos trabajados pudo influir en los resultados.

Al ácido linoleico, sobre todo a sus isómeros, en particular el CLA, se le atribuye disminuir la deposición citoplasmática de lípidos, demostrando actividad antilopogénica (Evans et al., 2002; Pereira et al, 2007 y 2008). Pereira et al., (2008) reportaron que los CLA en embriones bovinos *in vitro*, disminuyeron el diámetro de las gotas lipídicas mejorando la crioresistencia.

Accorsi et al., (2016) estudiaron el efecto de la adición de LA a un medio CIV semidefinido en concentración 100 μ M con adición de BSA, reportando una reducción en la tasa de desarrollo embrionario con respecto al control ($p < 0.05$); pero influyendo positivamente en el descenso del contenido lipídico intracelular, aumentando consecuentemente la supervivencia embrionaria luego de 24 h post-congelación y no afectando el número total de células por embrión. El mejoramiento en la supervivencia embrionaria se pudo fundamentar en que los ácidos grasos actuarán modificando la composición de los lípidos de la membranas embrionarias, influyendo en su fluidez (Accorsi et al., 2016).

Los resultados de este trabajo aunque son consecuentes con el obtenido por Accorsi et al., (2016), con respecto a la sobrevida embrionaria después de la congelación, no presentó el mismo comportamiento en cuanto al desarrollo embrionario, es así que se recomendaría realizar más estudios para ver el comportamiento del LA sobre el desarrollo embrionario.

Los ácidos grasos poli-insaturados son potentes inhibidores de la glucólisis y lipogénesis de novo, a través de la regulación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L-Piruvato quinasa (PK-L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al., 2005). El mecanismo por el cual el CLA afecta la acumulación de lípidos en el embrión es por una reducción en la incorporación y/o ensamblaje de los triglicéridos antes que por inhibición de la síntesis de novo (Pereira et al., 2014), esto también podría ser planteado para el LA.

Estudios en humanos han empleado ácidos grasos C¹³, en horas posteriores al cultivo (cuando el embrión cuenta con 8 células o más), concluyendo que el LA es más importante en los estadios finales de desenvolvimiento; debido a que estimula la proteína Kinasa C, que es crítica en el crecimiento y diferenciación celular (Haggarty et al., 2006, Accorsi et al., 2016). Estos ácidos grasos no son empleados en estadios iniciales de desarrollo (menos de 4 células), ya que en estas etapas los embriones poseen mayores concentraciones de ácidos grasos insaturados (Haggarty et al., 2006).

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se concluyó que el LA favorece la supervivencia a la congelación del embrión bovino, obtenido por técnicas *in vitro*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Frigorífico Bustos & Beltrán por el suministro de los ovarios y al Instituto de Reproducción Córdoba por el financiamiento de este estudio.

Bibliografía

- Accorsi, M.F., Leão, B.C., Rocha-Frigoni, N.A., Perri, S.H., and Mingoti, G.Z. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured *in vitro* with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increase in cryotolerance. *Zygote*, 2016, Vol. 24, n° 4, p. 485-494.
- Bailey, C.L., Sarmiento-Guzmán, J.A., Farmer, S.E., Gentry, G.T., Lynn, J.W., Bondioli, K.R., and Godke, R.A. Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on bovine oocyte lipid metabolism, lipid composition, and embryo cryotolerance. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015, Vol. 27, n° 1, p. 117-118. Disponible en URL: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv27n1Ab49>.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pégori, J.P., Foufelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, Vol. 115, n° 10, p. 2843-2854.
- Evans, M., Lin, X., Odle, J., and McIntosh, M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3t3-L1 preadipocytes. *Journal of Nutrition*, 2002, Vol. 132, n° 3, p. 450-455.

REDVET: 2017, Vol. 18 N° 11

Este artículo Ref. 111724_RED VET (Ref. prov. 11117_influenza) está disponible en
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111117.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111117/111724.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con
REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

- Gutteridge, JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 1995, Vol. 41, p. 1819 – 1828.
- Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., and Brattacharya, S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 2006, Vol. 21, n° 3, p. 766-773.
- Hasler, JF.; Henderson, WB.; Hurtgen, PJ.; Jin, ZQ.; McCauly, AD.; Mower, SA.; Neely, B.; Shuey, LS.; Stokes, JE.; and Trimmer, SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 1995, Vol. 43, n° 1, p. 141 – 152.
- Imai, K.; Kobayashi, S.; Goto, Y.; Dochi, O.; and Shimoira, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid-albumin. *Theriogenology*, 1997, Vol. 47, n° 1, p. 347. Disponible en URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)82474-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)82474-0).
- Jahanian, E., Nanaei, A.H., and Kor, N.M. The dietary fatty acids and their effects on reproductive performance of ruminants. *European Journal of Experimental Biology*, 2013, Vol. 3, n° 6, p. 95-97.
- Pereira, R.M., Baptista, M.C.; Vasques, M.I., Horta, A.E., Portugal, P.V., Bessa, R.J., Silva, J.C., Pereira, M.S., and Marques, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (10 t, 12 c CLA). *Animal Reproduction Science*, 2007, Vol. 98, n° 3-4, p. 292 – 301.
- Pereira, R.M., Carvalhais, I., Pimenta, J., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Santos, I.C., Marques, M.R., Reis, A., Silva Pereira, M., and Marques, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by 10 t, 12 c CLA supplementation during in vitro embryo culture. *Animal Reproduction Science*, 2008, Vol. 106, p. 322-332.
- Pereira Batista, R.J., Barbosa Raposo, N.R., Almeida Campos Jr., P.H., Pereira, M.M., Almeida Camargo, L.S., Campos Carvalho, B., Sundfeld Gama, M.A., and Moreira Viana, J.H. Trans-10, Cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of In Vitro-produced crossbred bovine embryos. *Journal Animal Science and Biotechnology*, 2014, Vol. 5, n° 1, p. 33. Disponible en URL: <https://dx.doi.org/10.1186/2049-1891-5-33>.
- Piccinato, C.A., Sartori, R., Sangsritavong, S., Souza, A.H., Grummer, R.R., Luchini, D., and Wiltbank, M.C. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17 β -estradiol and progesterone in dairy cows. *Journal Dairy Science*, 2010, Vol. 93, n° 5, p. 1934-1943.
- Tamargo-Santos, B.; Herrera-Belén, L, Bello-Alarcón, A., Cuellár, A., González-Rodríguez, H., Sierra-González, G., Morales-González, M., y Ortiz-Zamora, L. Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (Glicine max L) para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*, 2011, Vol. XXIII, n° 3, p. 5-14.