Universidade Federal de São João del-Rei

BIOTECNOLOGIA

GUILHERME ANTONIO DE GOUVÊA LOPES

AVALIAÇÃO O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO ACÚMULO LIPÍDICO DE OÓCITOS DA PROGÊNIE

São João del Rei

2021

GUILHERME ANTONIO DE GOUVÊA LOPES

AVALIAÇÃO O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO ACÚMULO LIPÍDICO DE OÓCITOS DA PROGÊNIE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Biotecnologia na Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Dom Bosco, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Ana Paula Madureira
Co-orientador: Paulo Henrique de Almeida Campos-Júnior

São João del-Rei
2021

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L956a

Lopes, Guilherme Antonio de Gouvêa.
AVALIAÇÃO O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO ACÚMULO LIPÍDICO DE OÓCITOS DA PROGÊNIE / Guilherme Antonio de Gouvêa Lopes ; orientadora Ana Paula Madureira; coorientador Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior. -- São João del-Rei, 2021.
22 p.

Trabalho de Conclusão (Graduação - Biotecnologia) - Universidade Federal de São João del-Rei, 2021.

1. CLA. 2. Reprodução. 3. Sudan. 4. Progênie. 5. Acúmulo lipídico. I. Madureira, Ana Paula, orient. II. Campos-Júnior, Paulo Henrique de Almeida, co orient. III. Título.

GUILHERME ANTONIO DE GOUVÊA LOPES

AVALIAÇÃO O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO ACÚMULO LIPÍDICO DE OÓCITOS DA PROGÊNIE

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Dom Bosco, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Ana Paula Madureira
Co-orientador: Paulo Henrique de Almeida Campos-Júnior

São João del-Rei, 12 de agosto de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dra Ana Paula Madureira – Universidade Federal de São João del-Rei
Prof. Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos-Júnior – Universidade Federal de São João del-Rei
Mestra Danielle Storino Freitas – Universidade Federal de São João del- Rei

_____

Prof. Dra. Ana Paula Madureira

AGRADECIMENTOS

Aos professores orientadores Ana Paula e Paulo, que durante vários meses me acompanharam pontualmente, dando todo o auxilio necessário para elaboração do projeto e para minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Engenharia de Biossistemas (DEPEB) e ao curso de Biotecnologia, ao Laboratório de Pesquisa em Reprodução (LAPRE), da Universidade Federal de São João del-Rei pela disponibilização dos recursos necessários para realização deste trabalho.

A todos que participaram da pesquisa, pela colaboração e disposição no processo de obtenção de dados, que mesmo em plena pandemia conseguimos realizar um trabalho ótimo.

Aos meus pais Miriam e Jadson e ao meu namorado Bernardo que me incentivaram a cada momento e não permitiram que eu desistisse em meus momentos de ansiedade e sempre me apoiaram em cada decisão.

Aos meus amigos, em especial Danielle, Bárbara, Talita e Caio pela compreensão, por todo suporte emocional e pela amizade que foi me dada durante o projeto.

A Pidac-AF e UFSJ pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

O ácido linoléico conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros posicionais do ácido linoléico encontrados em carne e derivados de ruminantes. É considerado um tipo de gordura *trans* comumente utilizada como suplementação alimentar devido aos efeitos benéficos na obesidade, cardiovasculares, parâmetros reprodutivos. Os lipídios presentes nos oócitos são em sua maioria triacilgliceróis armazenados como gotas lipídicas no citoplasma, o acúmulo lipídico nos oócitos se dá pelo o aumento da síntese dos lipídios ou a diminuição na oxidação dos ácidos graxos. A suplementação de dieta com CLA é uma área emergente, necessitando de estudos para elucidar seus benefícios nos parâmetros reprodutivos de animais e humanos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação do CLA, durante o período pré-gestacional e gestacional no acúmulo lipídico ovariano de camundongos fêmeas. Os animais foram selecionados aleatoriamente e distribuídos em três grupos: (1) controle (n = 10), (2) óleo de peixe (n = 10) e (3) CLA (n = 10), recebendo diariamente por meio de gavagem. Os tratamentos foram realizados em duas etapas: (i) fase de adaptação – 4 semanas antes do acasalamento e; (ii) acasalamento e gravidez. Não foi observada diferença na densidade do conteúdo lipídico dos oócitos incluídos em folículos antrais (P> 0,05). A ausência de efeitos colaterais demonstra o potencial de uso do CLA como molécula bioativa, abrindo novas perspectivas no campo da reprodução humana e animal.

Palavras chave: CLA, reprodução, progênie, sudan, acúmulo lipídico

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional isomers of linoleic acid found in meat and ruminant derivatives. It is considered a type of trans fat commonly used as food supplementation due to its beneficial effects on obesity, cardiovascular, reproductive parameters. The lipids present in oocytes are mostly triacylglycerols stored as lipid drops in the cytoplasm, the lipid accumulation in oocytes occurs due to the increase in lipid synthesis or the decrease in fatty acid oxidation. Diet supplementation with CLA is an emerging area, requiring further studies to elucidate its benefits on the reproductive parameters of animals and humans. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of CLA supplementation, during the pre-gestational and gestational period, on ovarian lipid accumulation in female mice. The animals were randomly selected and divided into three groups: (1) control (n = 10), (2) fish oil (n = 10) and (3) CLA (n = 10), receiving daily through gavage. The treatments were carried out in two stages: (i) adaptation phase – 4 weeks before mating and; (ii) mating and pregnancy. No difference was observed in the density of lipid content of oocytes included in antral follicles ($P>0.05$). The absence of side effects demonstrates the potential for using CLA as a bioactive molecule, opening new perspectives in the field of human and animal reproduction.

Key Words: CLA, reproduction, progeny, sudan, lipid accumulation

SUMÁRIO

RESUMO 6

ABSTRACT 7

INTRODUÇÃO 9

OBJETIVO 12

MATERIAL E MÉTODOS 12

RESULTADOS 13

DISCUSSÃO 15

CONCLUSÃO 16

REFERÊNCIAS 17

INTRODUÇÃO

A nutrição é um dos principais fatores ambientais envolvidos na saúde de humanos e outras espécies em diferentes estágios de desenvolvimento, com isso são realizados estudos com diferentes desafios nutricionais e suas respostas, como restrição de nutrientes, subnutrição, adição de vitaminas e minerais. Bomfim et al. (2004) afirmam que a nutrição materna durante a gestação pode alterar o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos dos fetos, com o desempenho reprodutivo na fase adulta influenciado pelo manejo nutricional da mãe durante a gestação. Desta forma, faz-se a busca de aditivos que possam atuar beneficamente no processo reprodutivo.

Dessa forma, o conceito de programação fetal descrito por Barker sugere que o estímulo durante certo período e a nutrição materna no estágio de desenvolvimento fetal têm a capacidade de gerar repercussões na vida adulta da progênie (Langley-Evans, 2004; Barker; 2004). É observado que o fornecimento de alimentos durante as fases de desenvolvimento fetal, de acordo com sua qualidade e quantidade, estão intimamente aos hábitos nutricionais maternos (Beck et al., 2012). Além disso foi demonstrado que as disfunções reprodutivas tem a capacidade de persistir por descendências familiares (Aiken et al., 2015), reserva folicular ovariana (Ainken et al., 2015), vascularização do ovário (Chan et al., 2015), ciclo estral (Connor et al., 2012), início precoce da puberdade (Sloboda et al., 2009) e aceleração da senescência reprodutiva (Guzman et al., 2006). Devido ao processo de reorganização celular durante o desenvolvimento e diferenciação gonadal, foliculogênese inicial, maturação de oócitos, fertilização, ativação do genoma embrionário e início das transições da morfogênese, as mudanças programadas para o feto são consideradas de extrema relevância (Fleming et al., 2012).

O processo de formação de gametas nas fêmeas é conhecido como foliculogênese. Este processo ocorre no início da vida pré-natal, com a formação, crescimento e maturação folicular, com a formação do folículo primordial até o estádio de folículo pré-ovulatório (Hirshfield, 1991). Entretanto, também são observadas continuações deste processo no período pós-natal pela atuação de células tronco, fornecendo suporte para situação com baixa reserva folicular (Johnson et al., 2004).

A maturação oocitária é o período no qual o oócito adquire a capacidade para ser fertilizado e manter o desenvolvimento embrionário, sendo este processo iniciado durante o desenvolvimento fetal. Os lipídios presentes nos oócitos são em sua maioria triacilgliceróis armazenados como gotas lipídicas no citoplasma (Fergunson e Leese, 1999). O oócito é incapaz

de metabolizar glicose, sendo esta função realizada pelas células do *cumulus* (Khurana e Niemann, 2000), por outro lado, é capaz de sintetizar ácidos graxos (Auclair et al., 2013). O acúmulo lipídico nos oócitos se dá de três possíveis maneiras, sendo elas: (i) o aumento da síntese dos lipídios, (ii) a diminuição na oxidação dos ácidos graxos (beta-oxidação) e (iii) o acúmulo de subprodutos do colesterol na matriz extracelular ou meio de cultura. E a composição de ácidos graxos insaturados (AGI) podem afetar as vias de sinalização e a susceptibilidade a danos oxidativos das células, fatores os quais que podem influenciar na reprodução (Khajeh et al., 2017).

Desta forma, faz-se a busca de aditivos que possam atuar beneficamente no processo reprodutivo. O ácido linoleico conjugado (CLA) refere-se a um grupo de isômeros posicionais do ácido linoleico, originado da biohidrogenação de bactérias ruminais, encontrando-se em carne bovina, leite e produtos lácteos (Kim et al., 2016) e possui funções fisiológicas importantes como os efeitos anticarcinogênicos, anti teratrogênicos, imunoestimulantes, anti-obesidade, entre outros Kozloski (2009).

Estudos com CLA na primeira lactação de vacas observaram tendências para efeitos benéficos sobre a reprodução (Castañeda-Gutiérrez et al., 2005). Veth et al. (2009) por meio de uma meta-análise, relataram os efeitos do CLA na primeira ovulação, concepção e o processo da gravidez, no qual vacas alimentadas com CLA apresentaram diminuição do tempo para concepção em 34 dias e 26% de probabilidade de gestação, entretanto os autores afirmam que os estudos foram projetados para avaliar os efeitos da CLA no desempenho da lactação e estudos individuais tinham muito poucos animais para permitir conclusões sobre o desempenho reprodutivo. O CLA também apresenta atuação nas metaloproteinases, inibindo sua síntese ou ativação, e de acordo com estudos realizados por Harris et al. (2001) a suplementação com este ácido graxo em ratas pode ser eficaz para a prevenção de ruptura prematura das membranas, associado com 30 a 40% de partos prematuros e incompetência cervical.

Os lipídios são as moléculas utilizadas como fonte de energia para que aconteça a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário (Fergunson; Leese, 2006), em maioria os triacilgliceróis (triglicerídeos) que são armazenados em gotas lipídicas no citoplasma (Fergunson; Leese, 1999). Estas gotas são organelas dinâmicas, compostas de uma camada interna hidrofóbica de lipídios neutros como os triacilgliceróis revestidos por uma camada única de moléculas anfifílicas como colesterol, fosfolipídios e proteínas (Brown, 2001; Martin et al., 2006) e são formadas na membrana microssomal do retículo endoplasmático (Marchesan et al., 2003).

Diversas espécies acumulam gotas lipídicas nos citoplasmas de seus oócitos (Mckeegan e Sturmey, 2012) já que a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias é a principal via de obtenção de ATP necessário para a manutenção das atividades celulares (Wang e Sum, 2007). Foi observado que em oócitos bovinos as gotas lipídicas ficam distribuídas de forma homogênea no interior da célula e que o conteúdo dessas organelas aumentou no estágio de mórula (Sudano et al., 2006), o que leva a uma provável relação entre o acúmulo de lipídios e o desenvolvimento da célula germinativa, embora ainda sendo desconhecido o período exato no qual ocorre esse acúmulo de lipídios em oócitos (Mckeegan e Sturmey, 2012).

Estudos demonstram que as alterações em ácidos graxos afetam os genes da via FABP3 durante a maturação in vitro que vai provocar o acúmulo lipídico oocitário (Perecin, 2017). Foi constatado por Aaderma et al. (2011) que alguns ácidos graxos não esterificados apresentam possibilidade de ter um acúmulo durante a maturação nuclear oocitária. Alguns exemplos de graxos são o palmítico e o esteárico que mostraram a capacidade de prejudicar a criopreservação dos blastocistos (Shehab-El-Deen et al., 2009). Agora o acido linolênico, o CLA, araquidônico demonstraram efeitos benéficos na qualidade embrionária, na criopreservação e também no meio de maturação (Marques et al., 2007; Lapa et al., 2011).

De acordo com Baumgard et al. (2002), o CLA pode reduzir o acúmulo de lipídeos por meio da redução dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) das enzimas lipogênicas. Batista et al. (2009) observaram que os mecanismos pelos quais o isômero trans-10, cis-12 inibem a síntese de lipídios seriam por meio da redução na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas no consumo de ácidos graxos circulantes, além do transporte dos mesmos. Estudos utilizando CLA demonstram que este é responsável por induzir modificações na composição de ácidos graxos de tecidos, reduzindo o conteúdo de triacilglicerol, ou interferindo nos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados (Park et al. 2000). Segundo Horton et al. (2002), o isômero de CLA trans-10, cis-12, tem efeito no metabolismo energético, acarretando em alterações na quantidade de lipídeos intracelulares, por meio da modulação na expressão gênica e na atividade enzimática sob o comando da família de fatores de transcrição e genes relacionados ao transporte de glicose para o interior da célula.

Como pode ser percebido, a aplicação dessas biotecnologias da reprodução no manejo de camundongos torna-se extremamente necessária para o aprimoramento do manejo reprodutivo,

sanitário e genético. Desta forma, faz-se importante o estudo de alimentos que possam contribuir para a saúde reprodutiva e fertilidade.

OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA) no acúmulo lipídico de oócitos da geração parental e da progênie.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamentos experimentais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa pela Universidade Federal de São João del-Rei (013/18). Camundongos fêmeas C57BL/6J, com idade de 4 semanas, foram mantidos em gaiolas em ambiente com temperatura controlada de 22 ±2 °C e com ciclos de luz artificial (12:12h). Os animais foram selecionados aleatoriamente e distribuídos nas dietas controle com solução salina (PBS 35 µl) (n=10), suplementação de CLA (Tonalin TG80 Basf®; 39,2% C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e 38,4% C18:2 *trans*-10, *cis*-12) 35 µl (n=10) e óleo de peixe 35 µl (Mundo dos Óleos®) (n=10), ambos com dieta oferecida *ad libitum*.

O tratamento das fêmeas suplementadas com CLA foi realizado em duas etapas: (i) fase de adaptação – 4 semanas antes do acasalamento, (ii) fase de cruzamento e gestação. Durante todo esse período, o grupo controle foi submetido às mesmas condições (exceto a suplementação com CLA). Aos 21 dias, as crias fêmeas foram separadas e destinadas à coleta de ovários para as análises posteriores, sendo eutanasiadas por asfixia em CO_2 e deslocamento cervical. Nas avaliações F1 e F2, as fêmeas foram cruzadas às 6 semanas de idade com machos de 10 semanas (1: 2, macho: fêmea) com fertilidade.

Coleta dos ovários e coloração

Todos ovários foram fixados em solução PFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ovários foram fixados e embebedados em parafina serão seccionados em 5 µm. A quantificação dos lipídios foi realizada pela técnica do corante vermelho do Sudan, conforme descrito por Sudano et al. (2012). A solução do corante vermelho do Sudan foi preparada com 3% de Sudan

IV para 70% de etanol em 100mL. Para estimar a quantidade relativa de gotículas de lipídios por oócito, imagens de folículos antrais (aproximadamente 12 oócitos antrais por grupo de animais) foram capturadas em objetivas de 40X. As imagens foram convertidas para preto e branco (32bt), os oócitos incluídos nos folículos antrais foram delimitados e analisados utilizando a área de densidade integrada comparada. Esta avaliação foi realizada por meio do software Image J.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 8 com o procedimento ANOVA de 2 vias. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado. Os tratamentos de dieta materna e dieta da prole foram considerados como variáveis independentes. Diferenças entre médias testadas com significância declarada em $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

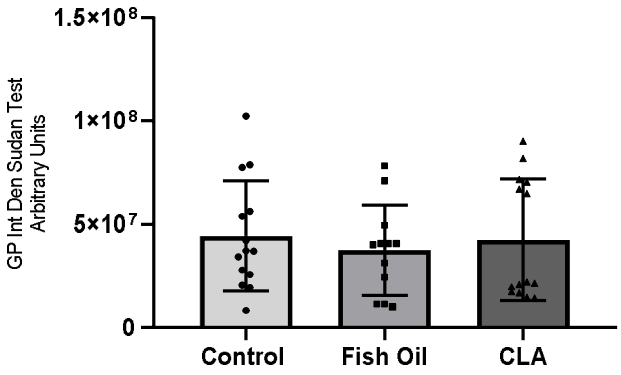

Figura 1. Densidade e intensidade das análises da coloração sudan para a geração parental através do software ImageJ. Não houve diferenças significativas (P>0,05).

Não foi observada diferença entre o acúmulo lipídico em oócitos de fêmeas suplementadas controle, óleo de peixe e CLA (P>0,05) (Figura 1).

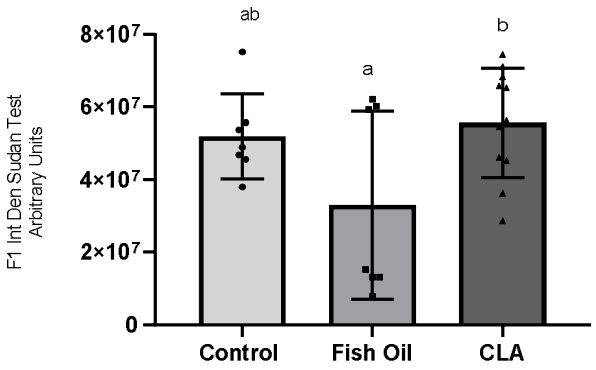

Figura 2. Densidade e intensidade das análises da coloração sudan para a geração F1 por meio do software ImageJ. Apresentou diferença significativa entre os tratamentos óleo de peixe e CLA (P = 0,0446).

A primeira geração de filhotes (F1) não foi observada diferença entre o tratamento controle e os grupos suplementados com óleo de peixe e CLA. No entanto foi observado aumento na quantidade de gotículas lipídicas dos animais suplementados com CLA quando comparados ao tratamento óleo de peixe (P = 0,0446) (Figura 2).

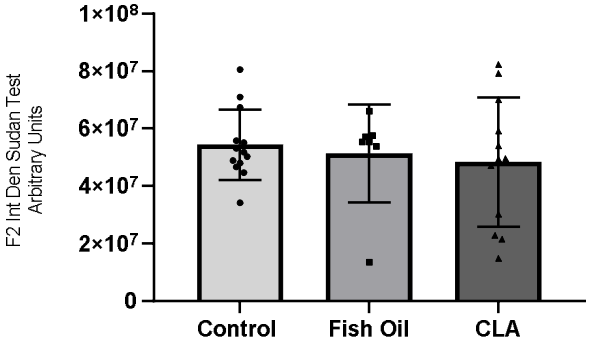

Figura 3. Densidade e intensidade das análises da coloração sudan para a geração F2 por meio do software ImageJ. Não houve diferenças significativas (P>0,05).

A segunda geração de filhotes (F2) não apresentou diferença na quantidade de gotículas lipídicas dos animais provenientes de fêmeas suplementadas nos tratamentos controle, óleo de peixe e CLA (P> 0,05) (Figura 3).

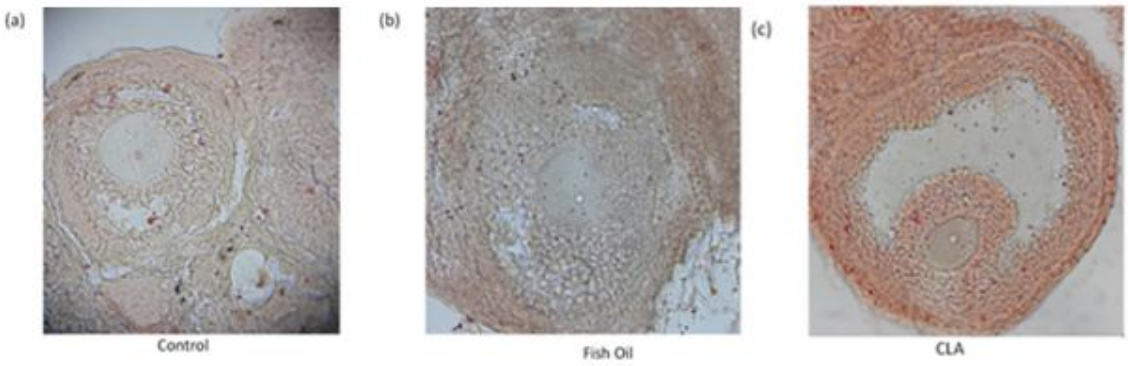

Figura 4. Imagem ilustrativa da coloração SUDAN IV.

DISCUSSÃO

Diversos estudos foram realizados para investigar os efeitos nutrigenômicos do CLA nos parâmetros anti-obesidade, imunológicos, cardiovasculares e anticarcinogênicas (Basak e Duttaroy, 2020; den Hartigh et al., 2019, Bialek et al., 2019). No entanto os estudos a respeito dos parâmetros reprodutivos e de dinâmica folicular com a utilização da suplementação de CLA ainda são incipientes.

Os efeitos negativos da obesidade na saúde das mães e de sua progênie estão bem estabelecidos na literatura (Reynolds et al., 2015; Gray et al., 2015). E os efeitos do CLA no desenvolvimento do tecido adiposo, no desenvolvimento muscular, no crescimento e na composição corporal são influenciados pelo sexo e podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento antes do início da puberdade (Poulos et al. 2001). Estudos com mulheres não grávidas demonstraram efeitos benéficos do CLA como modulador inflamatório (Gebauer et al., 2011; Penedo et al., 2013).

Durante o processo de maturação oocitária, os lipídios desempenham papel fundamental no metabolismo energético, como a presença de ácidos graxos nos oócitos (Kim et al., 2001; Lapa et al., 2005). No entanto, o metabolismo lipídico durante o processo de maturação oocitária ainda não foi bem elucidado (Sturmey et al., 2009). Os ácidos graxos poliinsaturados, compreendem cerca de 20% do total, sendo o ácido linolênico o mais abundante deles (Santos et al., 2008b) e acredita-se que os mesmos atuem regulando o momento da retomada da maturação nuclear do oócito e a expansão das células do cumulus, eventos críticos para o desenvolvimento oocitário e fertilização (Marei al., 2010). Gonzalos-Serrano et al. (2015)

relataram que vacas alimentadas com CLA protegido no rúmen apresentaram aumento na concentração de CLA no fluido folicular e oócitos, bem como melhor competência oocitária. Broughton et al. (2009) observaram que a inclusão de CLA na dieta de ratas não alterou a produção de PGF ou a taxa de ovulação, o que dificulta a elucidação desses mecanismos. Yi et al. (2012) também observaram que o número de presumidos oócitos e zigotos em camundongos alimentados com óleo de peixe foi reduzido em comparação ao CLA, enquanto em nosso estudo observou que ambos os tratamentos não apresentaram diferença. As gotas lipídicas são organelas dinâmicas, podendo aumentar de tamanho realizando o transporte de lipídios neutros até o interior da gota. E a lipólise e a beta-oxidação no interior do complexo cumulus oophorus (CCO) apresentam influência significativa no desenvolvimento embrionário (Dunning et al., 2014). Porém se desconhece o período exato em que ocorre a acumulação de lipídios em oócitos (Mckeegan e Sturmey, 2012).

Estudos de Pereira et al., (2008) com a inclusão de CLA no meio de cultura de embriões demonstraram redução na expressão de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos, levando à redução na deposição de lipídeos, diferentemente do observado no presente estudo, o qual o oócitos não apresentaram mudanças no acúmulo lipídico. Estudos utilizando o CLA demonstram que ele é responsável por induzir mudanças na composição dos ácidos graxos teciduais, reduzindo o conteúdo de triacilglicerol ou interferindo nos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados (Park et al. 2000), como um isômero do CLA *trans* -10, *cis*-12, tem efeito no metabolismo energético, resultando em alterações na quantidade de lipídios intracelulares, por meio da modulação da expressão gênica e atividade enzimática sob o comando da família de fatores de transcrição e genes relacionados ao transporte de glicose para o interior do folículo (Horton et al., 2002), no entanto mais estudos são necessários para avaliação melhor elucidação dos mecanismos relacionados a estes processos.

CONCLUSÃO

Não houve efeito deletério no acúmulo lipídico ovariano dos animais suplementados com CLA e sua progênie no presente estudo, demonstrando que essa suplementação pode ser utilizada sem prejuízo à saúde reprodutiva feminina e aproveitando os demais benefícios já elucidados com essa suplementação. Assim, mais investigações são necessárias para elucidar que os mecanismos de ação do CLA no acúmulo lipídico sobre sexo, tempo e dose específicos, e se suas respostas persistem nas gerações futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p62-69, 2011.

AIKEN, C. E.; TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. Transgenerational developmental programming of ovarian reserve. **Sci Rep**., 2015.

AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, 304 E599–E613, 2013.

BASAK, S.; DUTTAROY, A. K. Conjugated Linoleic Acid and Its Beneficial Effects in Obesity, Cardiovascular Disease, and Cancer. **Nutrients**, 12:1913, 2020.

BATISTA, R. I. T. P. Efeito do ácido linoleico conjugado trans-10, cis-12 na regulação do acúmulo de lipídios e expressão gênica em embriões produzidos in vitro. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia). **Escola de Ciências Biológicas da UFJF**, Juiz de Fora, MG, 2009.

BARKER, D. J. The developmental origins of cronic adult disease. **Acta Paediatrica Supplementum**, (446):26-33, 2004.

BAUMGARD, L. H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B. A. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2155, 2002.

BECK B.; RICHY S.; ARCHER Z. A.; MERCER, J. G. Ingestion of carbohydrate-rich supplements during gestation programs insulin and leptin resistance but not body weight gain in adult rat offspring. **Front. Physiol**. 3:224, 2012.

BIALEK, M., BIALEK, A.; CZAUDERNA, M. Conjugated Linoleic Acid Isomers Affect Profile of Lipid Compounds and Intensity of Their Oxidation in Heart of Rats with Chemically-Induced Mammary Tumors—Preliminary Study. **Nutrients**, 11:2032, 2019.

BOMFIM, M. A. D.; ALBUQUERQUE, F. H.M. A. R.; SOUZA, R. T. The role of nutrition on reproduction of sheep. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, p. 372-379, 2014.

BROWN, D. A. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. **Current Biology**, v.11, p.446-449, 2001.

CASTAÑEDA-GUTIERREZ, E.; OVERTON, T. R.; BUTLER, W. R.; BAUMAN, D. E. Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. **Journal of Dairy Science**, 88: 1078–1089, 2005.

CHAN, K. A.; BERNAL, A. B.; VICKERS, M. H.; GOHIR,W.; PETRIK, J. J.; SLOBODA, D. M. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring**. Biol. Reprod**. 92, 110, 2015.

CONNOR, K. L.; VICKERS, M. H.; BELTRAND, J.; MEANEY, M. J.; SLOBODA, D. M. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **J. Physiol**, 590, 2167–2180, 2012.

DEN HARTIGH, L. J. Conjugated Linoleic Acid Effects on Cancer, Obesity, and Atherosclerosis: A Review of Pre-Clinical and Human Trials with Current Perspectives. **Nutrients**, 11:370, 2019.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. **Reproduction**, v. 148: p 15-27. 2014.

FERGUNSON, E. M.; LEESE, H. J. Trygliceride content of bovine oocyte and early embryos. **J Reproduc Fertil**, v. 116, n. 2, p. 379-378, 1999.

FERGUSON, E. M; LEESE, H. J. A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol. Reprod. Dev**., v.73, p.1195-1201, 2006.

FLEMING, T. P.; VELAZQUEZ, V. A.; ECKERT, J. J.; LUCAS, E. S.; WATKINS, A. J. Nutrition on femalesduring the peri-conceptional period and effects on foetal programming and healthy of offspring. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 193-197, 2012.

GEBAUER, S. K.; CHARDIGNY, J. M.; JAKOBSEN, M. U.; LAMARCHE, B.; LOCK, A. L. Effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and cancer: a comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. **Nutrition**, 332–354, 2011.

GRAY, C.; VICKERS, M.; SEGOVIA, S. A.; ZHANG, X.; REYNOLDS, C. M. A Maternal High Fat Diet Programmes Endothelial Function and Cardiovascular Status in Adult Male Offspring Independent of Body Weight, Which is Reversed by Maternal Conjugated Linoleic Acid (CLA) Supplementation. **Plos One**, 10, 0115994, 2015.

GONZALOZ-SERRANO, A. F.; FERREIRA, R. F.; PIRRO, V.; LUCAS-HAHN, A.; HEINZMANN, J.; HADELER, K.; BAULAIN, U.; ALDAG, P.; MEYER, U.; PIECHOTTA, M.; JAHREIS, G.; DANICKE, S.; COOKS, C.; NIEMANN, H. Effects of long-term dietary supplementation with conjugated linoleic acid on bovine oocyte lipid profile. **Reproduction, Fertitily and Development**, 28, 1326-1339, 2015.

GUZMAN, C. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **J Physio**, 572, 97– 108, 2006.

HARRIS, M. A.; HANSEN, R. A.; VIDSUDHIPHAN, P.; KOSLO, J. L.; THOMAS, J. B.; WATKINS, B. A.; ALLEN, K. G. D. Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 65(1), 23-29, 2001.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol**, v.124, p.43-101, 1991.

HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; BONNER, W.; SABATIER; REINHARDT, D. P.; SADO, Y.; NINOMIYA, Y.; WILHELM, D.; RODGERS, R. J. Um novo modelo de desenvolvimento do ovário e folículos de mamífero. **PLoS One**, 8, 55578, 2013.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal Clinical Investigation**, v. 109, p. 1125-1131, 2002.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

KHAJEH, M.; RAHBARGHAZIB, R.; NOURIA, M.; DARABIA, M. Potential role of polyunsaturated fatty acids, with particular regard to the signaling pathways of arachidonic acid and its derivatives in the process of maturation of the oocytes: **Contemporary review. Biomedicine & Pharmacotherapy**, 94, 458–467, 2017.

KIM, J.H.; KIM, Y.; KIM, Y.J.; PARK, Y. Conjugated linoleic acid: Potential health benefits as a functional food ingredient. **Annual Review of Food Science and Technology**, 7, 221–244, 2016.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature an in vitro matured bovine oocytes. Reproduction, 122, 31–138, 2001.

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 2.ed. – Santa Maria: Ed. da UFSM, p. 216, 2009.

KHURANA, N.K; NIEMMAN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol Reprod**, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.

LANGLEY-EVANS, S. Fetal programming of adult disease: an overview. In: Langley-Evans S (ed) Fetal nutrition and adult disease: programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. **CABI**, Wallingford, pp 1–20, 2004.

LAPA, M.; MARQUES, C. C.; ALVES, S. P.; VASQUES, M. I.; BAPTISTA, M. C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A. E. M.; BESSA, R. J. B.; PEREIRA, R. M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acido n bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.904-910, 2011.

LAPA, M.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M.; VASQUES, M. I.; HORTA, A.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R.; PEREIRA, R. M. Fatty acid profile of oocytes and blastocysts during in vitro bovine embryo production. Reproduction in Domestic Animals, 40, 365, 2005.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v.139, p. 979– 988, 2010.

MARQUES, C. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animal**, v.109, p.116, 2007.

MARCHESAN, D.; RUTBERG, M.; ANDERSSON, L.; ASP, L.; LARSSON, T.; BORÉN, J.; JOHANSSON, B. R.; OLOFSSON, S. O. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. **J. Biol. Chem**., v. 278, p. 27293-27300, 2003.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.373-378, 2006.

MCKEEGAN, P. L., STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction Fertility and Development**, v.24, p.59-67, 2012.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M. Inhibition of hepatic stearoylCoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1486, p. 285-292, 2000.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; STORKSON, J.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition in Mice. **Lipids**, 32, 853–858, 1997.

PENEDO, L.; NUNES, J.; GAMA, M. A.; LEITE, P; QUIRICO-SANTOS, T. F. Intake of butter naturally enriched with cis9,trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. **The Journal of Nutritional Biochemical**, 24, 2144–51, 2013.

PERECIN, F. A proteína ligadora de ácidos graxos 3 e projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação in vitro de oócitos bovinos. **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA)**, 2017.

PEREIRA, R. M. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.322-332, 2008.

POULOS, S. P.; SISK, M.; HAUSMAN, D.; AZAIN, M. J.; HAUSMAN, G. J. Pre- and Postnatal Dietary Conjugated Linoleic Acid Alters Adipose Development, Body Weight Gain and Body Composition in Sprague-Dawley Rats. **Nutrient Metabolism**, 2001.

REYNOLDS, C.; VICKERS, M.; HARRISON, C.; SEGOVIA, S. A.; GRAY, C. High fat and/or high salt intake during pregnancy alters maternal meta-inflammation and offspring growth and metabolic profiles. **Physiology Reports**, 12399, 2014.

SANTOS, A. G. M.; PEREIRA, L. A. A. C.; VIANA, J. H. M.; RUSSO, R. C.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A. The CC-chemokine receptor 2 is involved in the control of ovarian folliculogenesis and fertility lifespan in mice. **Journal of Reproductive Immunology**, 2020.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L. M. R.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. **Reproduction in Domestic Animal**, v.44, p.140- 144, 2009.

SLOBODA, D. M.; HOWIE, G. J.; PLEASANTS, A.; GLUCKMAN, P. D.; VICKERS, M. H. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. **PLoS One,** 4, e6744, 2009.

STURMEY, R. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod Dom Anim**,.v.44, p.50–58, 2009.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D. S.; TATA. Lipidome signatures in the development of early bovine embryos. **Theriogenology**, 2016.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in Bos taurus indicus and Bos taurus taurus In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. **Biology of Reproduction,** 87, 1-11, 2012.

VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 92: 2662–2669, 2009.

WANG, Q.; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. Reproduction, **Fertility and Development**, v. 19, no. 1, p. 1–12, 2007.

YI, D.; ZENGB, S.; GUOA, Y. A diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids reduced prostaglandin biosynthesis, ovulation rate, and litter size in mice. **Theriogenology**, 78, 28–38, 2012.