







Revisão de literatura

Ácido linoleico conjugado como potencial bioativo para modulação e criotolerância de gametas e embriões

Conjugated linoleic acid as a potential bioactive molecule to modulates gamete and embryo cryotolerance

Danielle Storino Freitas¹ , Guilherme Antonio de Gouvêa Lopes¹ , Barbara Rodrigues Nascimento¹ , Luiza Aparecida Ansaloni Chagas Pereira¹ , Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista² , Paulo Henrique Almeida Campos Junior^{1*} 

¹Universidade Federal de São João del-Rei. São João del-Rei, MG, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Minas Gerais, Vila Rosário, MG, Brasil.

*Correspondente - paulohenrique@ufsj.edu.br

Seção: Medicina Veterinária

Recebido
22 de maio de 2020.
Aceito
6 de agosto de 2020
Publicado
20 de Outubro de 2020.

www.revistas.ufg.br/vet
Como citar - disponível no
site, na página do artigo.

Resumo

O ácido linoleico conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros posicionais do ácido linoleico encontrado em carne e laticínios de ruminantes. É um tipo de gordura trans muito utilizada por atletas para como suplemento alimentar devido a um suposto efeito de maximizar a utilização das reservas de gordura corporal. O interesse na suplementação de dietas e meios de cultura com o CLA é uma área emergente, exigindo estudos para elucidar seus benefícios nos parâmetros reprodutivos e na criopreservação. Dessa forma, o objetivo dessa revisão foi discutir os efeitos do CLA na criotolerância de oócitos, espermatozóides e embriões. Alguns estudos já demonstraram seu uso na criopreservação da linhagem germinativa. Entre esses, foi observado que a suplementação de CLA durante a maturação in vitro de oócitos pode aumentar sua viabilidade pós-congelamento e capacidade de desenvolvimento. Em relação ao uso de CLA no esperma, existem poucos estudos e seus resultados ainda são inconclusivos. Por último, estudos sobre a suplementação de CLA em meios de cultura de embriões mostraram resultados promissores, indicando que essa molécula bioativa é capaz de modular a captação de lipídios em blastômeros. No total, essas descobertas demonstram o potencial uso do CLA como uma molécula bioativa para melhorar a linha germinativa e a criotolerância ao embrião e abrir novas perspectivas no campo da reprodução humana e animal.

Palavras-chave: acúmulo lipídico, criopreservação, embrião, oócito, sêmen.

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional isomers of linoleic acid found in meat and dairy products from ruminants. It is a trans fat widely used by athletes as a food supplement, due to a supposed effect of maximizing the use of body fat reserves. The interest in diet and culture media

supplementation with CLA is an emerging area, demanding studies in order to elucidate its benefits in the reproductive parameters, as well as in cryopreservation. Therefore, the aim of this review was to discuss the effects of CLA on the oocytes, sperm and embryos cryotolerance. Some studies have already demonstrated its use in cryopreservation of germline. Among those, it was observed that CLA supplementation during oocyte in vitro maturation can increase their viability post-freezing and developmental capacity. Regarding the use of CLA on sperm, there are few studies and their results are still inconclusive. Finally, studies about CLA supplementation on embryo culture media have shown promising results, indicating that this bioactive molecule is able to modulate lipid uptake on blastomeres. Altogether, these findings demonstrate the potential use of CLA as a bioactive molecule to improve germline and embryo cryotolerance and open new perspectives on human and animal reproduction field.

Key-words: lipid accumulation, cryopreservation, embryo, oocyte, sperm.

Introdução

A criopreservação é um processo de preservação de organelas, células, tecidos ou quaisquer outras formações biológicas por resfriamento das amostras a temperaturas muito baixas⁽¹⁾. Isso ocorre porque o metabolismo biológico nas células vivas diminui drasticamente em baixas temperaturas, o que permite a preservação a longo prazo de células e tecidos vivos para pesquisa científica ou para muitas aplicações médicas. No entanto, o congelamento desprotegido é normalmente letal⁽²⁾. Um grande desafio para as células durante esse processo não são as baixas temperaturas (abaixo de -180 °C) durante o armazenamento, ao contrário, é a letalidade de uma zona de temperatura intermediária (-15 a -60 °C) pela qual a célula deve passar duas vezes – durante o resfriamento e o aquecimento⁽³⁾. As velocidades de resfriamento e descongelamento podem afetar amplamente as reações físico-químicas e biofísicas, afetando também a taxa de sobrevivência.

Além disso, as lesões criogênicas envolvem ruptura osmótica causada por altas concentrações de solutos e pela formação de cristais de gelo intra e extracelulares⁽²⁾. Para mitigar esses efeitos nocivos, os crioprotetores são normalmente usados para aumentar a concentração total de todos os solutos no sistema e reduzir a quantidade de gelo formado em qualquer temperatura. Para serem biologicamente aceitáveis, os crioprotetores devem ser capazes de penetrar nas células e ter baixa toxicidade^(1,2). Muitos compostos têm essas propriedades, incluindo glicerol, dimetilsulfóxido, etanodiol e propanodiol. Independentemente da técnica de criopreservação, seja permitindo o congelamento (criopreservação convencional) ou evitando o congelamento (vitrificação), o crioprotetor deve acessar todos os componentes celulares⁽²⁾. Entretanto, barreiras como membranas celulares e gotículas lipídicas intracitoplasmáticas comprometem a difusão e osmose, interferindo na introdução e remoção de crioprotetores durante o

congelamento e descongelamento. Assim, a modulação das propriedades da membrana e a quantidade de lipídios intracelulares podem melhorar a eficiência da sobrevivência celular durante o processo de criopreservação.

Nesse sentido, estudos sobre dieta e suplementação com ácidos graxos em meios de cultura *in vitro*, como o ácido linoléico conjugado (CLA), têm sido utilizados como estratégia para modular a composição da membrana e a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos, visando a melhorar a eficiência da criopreservação de gametas^(4, 5) e embriões^(6,7). Diante desse cenário, o objetivo desta revisão é fornecer um estudo sobre o uso do CLA na criopreservação na linha germinativa e de embriões, descrevendo os principais achados publicados na área.

1. Síntese biológica do ácido linoléico conjugado (CLA)

O ácido linoléico conjugado (CLA) refere-se a uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico, caracterizado por ligações duplas conjugadas, não separadas por um grupo metileno, como no ácido linoléico. Essas ligações duplas geralmente estão localizadas nas posições 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12, 11 e 13, e podem ocorrer nas configurações *cis-cis*, *trans-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*⁽⁸⁾. Dentre todas as combinações possíveis, apenas duas têm bioatividade comprovada (CLA *cis-9, trans-11* e CLA *trans-10, cis-12*), com efeitos na redução da carcinogênese⁽⁹⁾, antiobesidade^(10,11,12), alteração na composição lipídica do leite bovino⁽¹³⁾, afeta positivamente o diabetes mellitus, além de melhorar a resposta imunológica⁽¹⁴⁾. Esses isômeros podem ser sintetizados no rúmen, tecido adiposo e glândula mamária, em um processo conhecido como síntese endógena.

1.1. Síntese ruminal

A síntese do CLA no rúmen ocorre por meio da biohidrogenação incompleta dos ácidos graxos poliinsaturados da dieta por microrganismos ruminais⁽¹⁵⁾. Este evento requer a lipólise prévia de ácidos graxos esterificados na forma de triglicerídeos, fosfolipídios e galactolipídios, por lipases microbianas presentes no rúmen. Os ácidos graxos livres insaturados da lipólise são, então, submetidos à biohidrogenação. Durante o processo de biohidrogenação do ácido linoléico, o isômero *cis-9, trans-11* é o primeiro intermediário formado pelas bactérias ruminais. A enzima isomerase $\Delta 12$ *cis*, $\Delta 11$ *trans* catalisa a isomerização de ácidos linoléicos em *cis-9, trans-11*, que é saturado na posição da ligação dupla *cis-9* pela enzima redutase, formando ácido vacênico (C18:1). Essa enzima redutase precisa de radicais carboxila livres (COOH) para completar a reação, o que requer lipólise prévia dos lipídios da dieta. A próxima etapa envolve uma redução subsequente do ácido vacênico (C18:1) para o ácido esteárico (18:0)^(16,17). Porém, durante esse evento, os intermediários desse processo podem passar pelo rúmen, movimentar-se pela corrente sanguínea e serem absorvidos e incorporados à gordura dos tecidos.

Griinari e Bauman⁽¹⁸⁾ propuseram que o isômero do *cis-9, trans-11*, pode eventualmente ser convertido em C18:1 *trans-10* no conteúdo ruminal. Essa especulação sobre a

produção de CLA *trans*-10, *cis*-12 foi confirmada posteriormente. Coakley *et al.* e Ando *et al.* demonstraram que *Bifidobacterium sp*, *Propionibacterium sp*, *Lactococcus sp*, *Streptococcus sp* e *Lactobacillus sp*, isolados de outros habitats, também podem produzir CLA *trans*-10, *cis*-12^(19,20). Essas bactérias podem ser encontradas no rúmen, embora em número muito pequeno, contribuindo para a bio-hidrogenação e formação do CLA *trans*-10, *cis*-12. A população desses microrganismos aumentou significativamente no rúmen de animais alimentados com dietas concentradas, o que é consistente com a maior produção de CLA *trans*-10, *cis*-12⁽²¹⁾. De acordo com Griinari *et al.*⁽²²⁾ e Chouinard *et al.*⁽²³⁾, existem algumas condições que podem intensificar a síntese ruminal de CLA, como alterações no ambiente ruminal, incrementos na quantidade de ácidos graxos na dieta e modificações no pH ruminal.

1.2. Síntese não ruminal

A síntese de CLA endógeno nos tecidos começa quando o ácido graxo C18:1 é dessaturado pela enzima $\Delta 9$ dessaturase (SCD), presente na glândula mamária e no tecido adiposo⁽²⁴⁾. Em animais, a dessaturação ocorre apenas até o carbono 9 por causa da ausência das enzimas $\Delta 12$ e $\Delta 15$ dessaturases, presentes apenas em vegetais. Consequentemente, o ácido linoléico é considerado um ácido graxo essencial e deve ser fornecido por meio de dieta, pois é um precursor essencial na síntese das prostaglandinas. SCD introduz uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 de ácidos graxos. As reações catalisadas por dessaturases são essenciais para manter a fluidez das membranas celulares⁽²⁵⁾.

Para verificar a hipótese de síntese endógena de CLA pela enzima SCD, Griinari *et al.*⁽²⁴⁾ infundiram no abomaso de vacas em lactação uma mistura de C18:1 *trans*-11 e C18:1 *trans*-12 (50% -50%) e observaram um incremento de 31% no CLA *cis*-9, *trans*-11 secretado no leite. Com base nisso, concluíram que os animais são realmente capazes de produzir CLA *cis*-9, *trans*-11 endogenamente. No outro experimento, avaliando a contribuição da síntese endógena de CLA via SCD, os autores infundiram óleo de *sterculia* (um inibidor de SCD) e estimaram que 64% do CLA no leite de ruminantes é produzido endogenamente. Corroborando esses dados, Corl *et al.*⁽²⁶⁾ também relataram uma redução de 60-65% no isômero *cis*-9, *trans*-11 quando os animais receberam uma dieta suplementada com óleo de *sterculia*. Kay *et al.*⁽²⁷⁾ estimaram que 87 a 100% do isômero *cis*-9, *trans*-11, presente na gordura do leite, foi produzido por via endógena em vacas a pasto e suplementadas com óleo de *sterculia*, e também demonstraram que é possível aumentar os níveis do isômero *cis*-9, *trans*-11 no leite, por meio da suplementação de ácidos graxos trans C18:1.

Para avaliar o efeito biológico do CLA na atividade da SCD, Lee *et al.*⁽²⁸⁾ utilizaram camundongos como modelos experimentais, suplementando a dieta com 42% do isômero *cis*-9, *trans*-11 e 44% do *trans*-10, *cis*-12. Nesse estudo, foi observada uma redução relativa na expressão do RNA mensageiro hepático (mRNA) da SCD. Em outro experimento em que apenas o isômero *cis*-9, *trans*-11 foi usado, a expressão de SCD não foi alterada. Com base nesses dados, os autores inferiram que o isômero *trans*-10, *cis*-12 é responsável pelos efeitos inibitórios da expressão da SCD, resultado confirmado posteriormente por Park *et al.*⁽²⁹⁾. De acordo com esses dados, assume-se que o isômero

trans-10, cis-12 atua inibindo diretamente o SCD e que provavelmente a ligação dupla na posição *cis-12* é a mais importante nesse efeito inibitório do CLA.

2. CLA na modulação da acumulação de lipídios intracelular

A homeostase lipídica em células de mamíferos é regulada por uma família de fatores de transcrição denominada proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP). Esses fatores de transcrição controlam a atividade e a expressão de mais de 30 genes relacionados à síntese de colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídios⁽³⁰⁾. Estudos *in vivo* e *in vitro* relataram que o CLA *trans-10, cis-12* influencia a quantidade de lipídios intracelulares por meio da modulação na expressão gênica e na atividade de enzimas sob o comando de SREBP.

Durante a lipogênese, a primeira molécula de ácido graxo (ácido palmítico) é obtida de uma molécula de acetil-CoA e sete de malonil-CoA. Requer duas enzimas fundamentais, (1) acetil-CoA carboxilase (ACC) e (2) sintases de ácidos graxos (FAS), responsáveis pela síntese de malonil-CoA e ácido palmítico, respectivamente. Estudos independentes^(31,32) demonstraram que a infusão do isômero *trans-10, cis-12* no abomaso bovino reduziu significativamente a expressão dessas enzimas lipogênicas, diminuindo, conseqüentemente, o teor de gordura do leite (48%), a capacidade lipogênica do tecido (82%) e a expressão das enzimas glicerol fosfato aciltransferase e acil glicerol fosfato aciltransferase. Da mesma forma, estudos *in vitro* realizados por Pereira *et al.*⁽⁶⁾ demonstraram que a suplementação de CLA em meios de cultura reduziu o acúmulo de lipídios em embriões bovinos. Posteriormente, Batista *et al.*⁽⁷⁾ demonstraram que essa redução ocorre por meio da modulação na expressão da enzima 1-acilglicerol 3-fosfato 0-aciltransferase (AGPAT) envolvida na síntese de triglicerídeos. Portanto, a suplementação de CLA tem sido proposta como uma alternativa para diminuir a regulação negativa de genes relacionados à lipogênese⁽³³⁾, inibir a síntese e a captação de triacilgliceróis e, conseqüentemente, reduzir o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos^(34, 35). Apesar de todas essas descobertas empolgantes, os mecanismos que controlam a redução de lipídios induzida pelo CLA ainda não foram totalmente elucidados.

3. CLA na regulação da função da membrana celular

A membrana celular envolve a célula, delimitando e mantendo as diferenças entre o citosol e a matriz extracelular. Dentro das células eucarióticas, as membranas do núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndrias e outras organelas delimitadas por membrana mantêm suas propriedades físico-químicas, bem como a fisiologia⁽³⁶⁾. Essa estrutura é formada por uma bicamada lipídica (fosfolipídios, glicolipídios e esteróis) e proteínas, desempenhando papel central em seu funcionamento⁽³⁷⁾. Durante a criopreservação, os cristais de gelo intracelular podem romper a membrana plasmática e liberar componentes celulares⁽³⁸⁾. A incorporação de ácidos graxos na dupla camada fosfolipídica da membrana plasmática altera sua fluidez e, conseqüentemente, pode interferir no metabolismo celular⁽³⁹⁾. Os componentes presentes nos meios de cultura *in vitro* podem levar ao acúmulo de lipídios e seu conteúdo excessivo causaria alterações

na membrana plasmática, como alterações na fluidez e funções⁽³⁴⁾, indicando uma correlação positiva entre a fluidez da membrana e a tolerância ao congelamento. Essas modificações ocorrem principalmente em razão das mudanças na expressão de genes relacionados à adipogênese⁽⁴⁰⁾. Um dos principais efeitos da suplementação de CLA na criopreservação embrionária é a redução da expressão de enzimas, causada por agentes químicos responsáveis pela catálise de triglicerídeos, reduzindo a exposição lipídica nas células embrionárias⁽⁶⁾. Além disso, Leite *et al.*⁽⁴¹⁾ propuseram que a adição de CLA no meio de cultura pode afetar a digestão enzimática da zona pelúcida, alterando a taxa de eclosão dos embriões.

A suplementação dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 altera o perfil lipídico de embriões bovinos, reduzindo o acúmulo de gotículas lipídicas⁽⁴²⁾. O isômero *trans*-10, *cis*-12 atua na absorção de ácidos graxos livres sem aumentar a lipólise, na incorporação do CLA na bicamada lipídica da membrana da célula embrionária, aumentando a fluidez da membrana^(6,42,43) e, conseqüentemente aumentando a resistência à criopreservação.

4. Efeito da suplementação com CLA na criopreservação do sêmen

A espermatogênese é um processo biológico complexo em que uma célula germinativa diplóide (espermatogônias), após divisões mitóticas em série, dá origem a células germinativas haplóides. Essas espermátides se diferenciam gradativamente em espermatozóides que, após a espermição, são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos. Esses espermatozóides são transportados passivamente para o epidídimo, onde adquirem motilidade, em um processo denominado maturação espermática⁽⁴⁴⁾. Morfologicamente, os espermatozóides são divididos em cabeça (acrossomal e pós-acrossomal) e cauda⁽⁴⁵⁾. A cauda do gameta masculino é composta pelo pescoço, peça intermediária principal e terminal⁽⁴⁶⁾. A membrana plasmática é responsável por envolver todos os componentes dos espermatozóides e é composta por camadas de lipídios e proteínas, como as que contêm fosfolipídios, colesterol, glicolipídios e diferentes tipos de proteínas⁽⁴⁷⁾. A composição lipídica da membrana plasmática do espermatozóide desempenha um papel importante nas alterações fisiológicas que levam à fertilização, além de afetar a resposta dos espermatozóides ao resfriamento e congelamento⁽⁴⁸⁾. Essa composição lipídica na membrana pode ser manipulada tanto *in vivo* como *in vitro*.

As diferenças na congelabilidade de espécies dos espermatozóides em touros são em parte atribuíveis ao conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de sua membrana plasmática⁽⁴⁹⁾. Nesse sentido, foi demonstrado que a suplementação alimentar com uma ampla variedade de suplementos de PUFA pode alterar o perfil de ácidos graxos do esperma. Estudos com carneiros^(50,51,52), touros^(53,54), aves e javalis^(55,56) sugeriram benefícios após a suplementação dietética de PUFA em alguns parâmetros. Como outros ácidos graxos poliinsaturados, o CLA pode ser incorporado aos fosfolipídios da membrana e também realizar efeitos biológicos, como demonstrado no caso dos ácidos graxos ômega-3⁽⁵⁷⁾. No entanto, usando o coelho como modelo experimental, Abdelatty *et al.*⁽⁵⁸⁾ relataram que a suplementação de CLA (uma mistura da mesma proporção dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12) a longo prazo pode alterar o potencial reprodutivo dos machos, especialmente se alimentados com uma dose superior a 0,5

%. Nesse estudo, os autores observaram que a suplementação com 1% de CLA diminuiu a motilidade espermática e a motilidade progressiva, além de diminuir a concentração testicular de L-carnitina e α -tocoferol. Essa diminuição na quantidade de antioxidantes no testículo foi associada ao aumento da apoptose nas células da espermatogônia, nos túbulos seminíferos nos grupos tratados com CLA.

Resultado semelhante também foi observado por Karimi *et al.*⁽⁵⁹⁾ em touros holandeses. Avaliando o efeito da suplementação de CLA na dieta sobre a qualidade e congelabilidade dos espermatozoides, os autores não observaram o efeito do CLA no volume do sêmen, concentração e produção total de esperma ($p > 0,05$). No entanto, a proporção de espermatozoides com morfologia anormal no sêmen fresco aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo alimentado com CLA em comparação com o grupo controle. Além disso, no grupo alimentado com CLA, a proporção de espermatozoides pós-descongelamento com morfologia anormal na semana 10 do ensaio foi significativamente maior no CLA do que no grupo controle ($p < 0,05$). A motilidade progressiva tendeu a aumentar no grupo alimentado com CLA, embora a suplementação dietética não tenha afetado outros parâmetros CASA ou a viabilidade em espermatozoides frescos e descongelados⁽⁵⁹⁾.

A adição de ácidos graxos em meios de criopreservação do sêmen pode influenciar a motilidade espermática após o descongelamento, possivelmente por manter a fluidez da membrana por causa da sua incorporação em bicamadas lipídicas. Maldjiana *et al.*⁽⁶⁰⁾ relataram que a presença de lipídios como diluentes para resfriamento e congelamento são essenciais para a troca de componentes em um ambiente extracelular⁽⁶¹⁾. No sêmen ovino, a adição de ácido oléico-linoléico ao meio de criopreservação resultou em um efeito benéfico na preservação da viabilidade das células espermáticas⁽⁶²⁾. Espermatozoides suínos incubados por 4 horas a 37 °C em meio de diluição contendo ácidos oléico e linoléico demonstraram melhora significativa na motilidade e viabilidade⁽⁶³⁾. O uso do ácido linoléico no meio de criopreservação do sêmen bovino causou melhora na motilidade espermática após o descongelamento, relacionando esse resultado a uma possível manutenção da fluidez da membrana com a incorporação do ácido linoléico pela bicamada lipídica⁽⁶⁴⁾. Segundo Kaeoket⁽⁶⁵⁾, a suplementação de extensores de sêmen com alguns ácidos graxos seria uma estratégia promissora para minimizar as espécies oxidativas de oxigênio e também para proteger a membrana plasmática.

Poucos estudos avaliaram o impacto do CLA na criopreservação de espermatozoides: Soares *et al.*⁽⁶⁶⁾ demonstraram que o uso dos isômeros do CLA (*cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12*) no meio de diluição de espermatozoides bovinos não causou alterações evidentes na viabilidade e motilidade. Porém, no tratamento com 50 μ M de CLA, os espermatozoides apresentaram os maiores valores de velocidade média, além de apresentarem taxa de fertilização satisfatória⁽⁶⁷⁾. Já no tratamento com 100 μ M de CLA, foram observados espermatozoides com maior percentagem de membrana íntegra e alto potencial mitocondrial, porém nenhuma dessas diferenças foi significativa⁽⁶⁶⁾.

Mais recentemente, Teixeira *et al.*⁽⁵⁾ analisaram o uso de CLA 50 μ M na criopreservação de sêmen de javalis e não observaram vantagens na viabilidade e integridade espermática pós-descongelamento. Em caso contrário, Karimi *et al.*⁽⁵⁹⁾ demonstraram que touros da

raça holandesa que receberam dieta suplementada com CLA apresentaram aumento da motilidade progressiva dos espermatozoides, mas essa mudança não trouxe benefícios significativos; entretanto, esses autores não observaram nenhuma outra vantagem dessa suplementação em amostras frescas e congeladas/descongeladas. De maneira geral, os dados disponíveis na literatura sobre os parâmetros do sêmen do CLA são inconclusivos, exigindo mais estudos.

5. Efeito da suplementação com CLA na criopreservação de oócitos

Em mamíferos, as células germinativas se desenvolvem rodeadas por células somáticas, formando folículos ovarianos. A foliculogênese ovariana inicia-se durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que os folículos primordiais dormentes são ativados e crescem até os folículos ovulatórios, que na ovulação liberam oócitos metafásicos II⁽⁶⁸⁾. Os lipídios presentes nos oócitos são principalmente triacilgliceróis armazenados como gotas lipídicas no citoplasma⁽⁶⁹⁾. Possivelmente, ocorre o acúmulo de lipídios no oócito: (i) aumento da lipogênese, (ii) diminuição da oxidação de gordura beta e (iii) aumento da captação de colesterol da matriz extracelular ou meio de cultura. De acordo com Baumgard *et al.*⁽³¹⁾, o CLA diminui os lipídios por regulação negativa das enzimas lipogênicas e também reduz os níveis das enzimas utilizadas no consumo das gorduras circulantes⁽⁷⁾.

A demanda pela preservação da fertilidade das mulheres tem aumentado ao longo dos anos, principalmente por causa das mudanças socioeconômicas que levaram ao adiamento usual da gravidez. Além disso, o número crescente de diagnósticos de câncer infantil em idade não reprodutiva e as melhorias nos tratamentos do câncer afirmam a necessidade de preservar os gametas infantis para serem usados após a remissão do câncer. Para preservação da fertilidade feminina, a criopreservação de oócitos seria a melhor opção⁽⁷⁰⁾, porém, devido às suas características morfológicas, principalmente em razão do tamanho do oócito, sua criopreservação é altamente dificultada e menos eficiente quando comparada à criopreservação de embriões e espermatozoides⁽⁷¹⁾.

Além disso, a criopreservação de oócitos é muito interessante para todas as espécies animais, especialmente para fins zootécnicos. Nos últimos anos, alguns avanços foram alcançados nesse campo, aumentando a sobrevivência oocitária após a criopreservação, entretanto os protocolos atuais ainda são ineficientes. Os gametas femininos são células grandes, com uma taxa de área/superfície da membrana reduzida. Assim, a formação de cristais de gelo durante a criopreservação ocorre com maior frequência, resultando em morte celular após o descongelamento. Além disso, o estresse de criopreservação modifica a zona pelúcida ou o ooplasma, ocasionando danos estruturais e funcionais⁽⁷²⁾. Ademais, as propriedades da membrana afetam o fluxo da água e dos crioprotetores, tornando o processo ainda mais difícil e às vezes inviável⁽⁷³⁾. A conformação lipídica de embriões e oócitos ainda é considerada um parâmetro de qualidade e criotolerância, principalmente porque os principais danos relacionados à criopreservação ocorrem por causa das modificações da membrana ou lipídios intracelulares⁽⁷⁴⁾. Já se sabe que os oócitos bovinos são mais resistentes à criopreservação em comparação com outras espécies de mamíferos investigadas, e alguns autores sugeriram que isso se

deve às suas diferenças na composição lipídica⁽⁷⁵⁾. Mesmo em bovinos, a diferença entre as raças é notável, como o número de gotículas citoplasmáticas e a competência oocitária⁽⁷⁶⁾. Aardema *et al.*⁽⁷⁷⁾ observaram que a suplementação de gordura em meio de cultura *in vitro*, como o ácido linoléico, tem efeitos positivos na maturação oocitária, desenvolvimento de blastocistos e aumento da tolerância à criopreservação de oócitos bovinos. Ferreira *et al.*⁽⁷⁸⁾ sugeriram que o controle de qualidade dos meios de cultura *in vitro* é relevante para a compreensão dos processos de criopreservação.

Em 2011, Lapa *et al.*⁽⁴⁾ estudaram o efeito do CLA na maturação do oócito e na composição lipídica dos complexos cumulus-oócito (COCs). Eles não observaram diferenças significativas na maturação ou nas taxas de produção de embriões. Por outro lado, a maturação do oócito em meio suplementado com CLA (100 mM) levou a um maior número de embriões com melhor qualidade no dia 8, em comparação com o grupo controle ($7,7 \pm 3,3$ a $0,0 \pm 0,0$ com muito boa qualidade e $32,2 \pm 5,7$ a $23,1 \pm 7,4$ com boa qualidade, respectivamente). Conseqüentemente, esse achado indica que o ambiente de maturação tem uma influência importante na capacidade do oócito de gerar embriões saudáveis com a capacidade de atingir níveis mais avançados de desenvolvimento e, em última instância, que a suplementação de CLA nesse estágio modula o metabolismo energético do oócito e melhora a criotolerância do embrião.

Estudos realizados por Matos *et al.*⁽⁷⁹⁾ investigaram o efeito do CLA na competência do desenvolvimento do oócito após exposição a crioprotetores seguida ou não de vitrificação e aquecimento. Eles observaram que a suplementação de CLA melhorou as taxas de sobrevivência dos oócitos após a vitrificação, bem como as taxas de clivagem, provavelmente devido à redução dos danos. Eles também propuseram que a permeabilidade da membrana de ambos, água e crioprotetores, seria influenciada pela presença de CLA e, dessa forma, foi demonstrado que oócitos bovinos maturados em meio com CLA são mais resistentes ao estresse osmótico, reduzindo o dano celular. Além disso, esses oócitos apresentaram uma taxa reduzida de influxo de crioprotetores (E.G. e DMSO 10%), o que também pode ser responsável pela melhoria da qualidade dos embriões. Juntos, esses achados indicam que além da modulação do fluxo de água e crioprotetores através da membrana celular, a suplementação de CLA melhora a viabilidade do oócito pós-congelamento, o que fornece uma ferramenta promissora para a preservação da fertilidade feminina.

6. Efeito da suplementação com CLA na criopreservação de embrião

O acúmulo lipídico está associado à perda da viabilidade embrionária e ao aumento das lesões causadas pela criopreservação, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário⁽⁸⁰⁾. Leite *et al.*⁽⁴¹⁾ avaliaram que a suplementação dos meios de cultura com o isômero do ácido linoléico conjugado *trans*-10, o *cis*-12 reduziu a deposição de lipídios intracitoplasmáticos em células embrionárias. De acordo com estudos de Pereira *et al.*⁽⁶⁾, a adição de CLA no meio de cultura leva à redução da expressão de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos, como a acilglicerol 3-fosfato aciltransferase responsável por catalisar a síntese de triglicerídeos, resultando, conseqüentemente, na redução da deposição de lipídios em células embrionárias.

Os embriões produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis ao congelamento convencional ou vitrificação do que os *in vivo*, tornando este um dos principais obstáculos para a expansão da tecnologia de criopreservação^(81,82,83). A criotolerância reduzida de embriões PIV, especialmente aqueles cultivados em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB), foi correlacionada a um acúmulo excessivo de gotículas de lipídios ao longo do desenvolvimento embrionário *in vitro*^(84,74,4). Os triacilgliceróis correspondem à maioria dos lipídios intracelulares encontrados em oócitos e embriões^(69,85,86) e, enquanto em embriões bovinos *in vivo* os triacilgliceróis representam 40-50% da massa lipídica total, em embriões *in vitro* podem chegar a 88%⁽⁸⁶⁾. A fim de evitar o acúmulo indesejável de lipídios, vários estudos têm tentado substituir o SFB no meio de cultura⁽⁸⁷⁾. Apesar de seus efeitos prejudiciais sobre a qualidade embrionária⁽⁸⁸⁾, SFB contém substâncias necessárias para o desenvolvimento embrionário, como ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, quelantes de metais pesados e fatores de crescimento⁽⁸⁹⁾ e, portanto, a dificuldade de evitar ou encontrar um adequado substituto para SFB na preparação de meio de cultura PIV⁽⁴²⁾.

Nesse contexto, para o sucesso da criopreservação de embriões, melhores técnicas de criopreservação devem ser desenvolvidas, ou mudanças na composição molecular dos meios de cultura de embriões devem ser feitas. A otimização da criotécnica tem apresentado sucesso limitado, enquanto as mudanças nos sistemas de produção *in vitro* se mostram mais promissoras, com a produção de embriões mais criotolerantes e de melhor qualidade⁽⁸⁴⁾. Estudos emergentes encontraram moléculas capazes de modular mecanismos moleculares que inibem a captação de lipídios pelas células. Uma das moléculas mais promissoras é o CLA, que atua especificamente nos adipócitos, reduzindo a captação de ácidos graxos sem aumentar a lipólise^(90,91). A suplementação de meio contendo soro para cultura embrionária com CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentou a taxa de criossistência de blastocisto em 24 horas após a cultura pós-aquecimento⁽⁶⁾. Embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio contendo CLA também demonstraram maior resistência à micromanipulação e criopreservação. Além disso, a adição de CLA *trans*-10, *cis*-12 ao meio de cultura não afetou a taxa de clivagem, a proporção sexual dos embriões, a qualidade ou o desenvolvimento do estágio de blastocisto e reduziu significativamente o acúmulo de lipídios⁽⁶⁾. Em contraste, Dias *et al.*⁽⁹²⁾ avaliaram a inclusão do CLA na cultura *in vitro* de embriões bovinos e observaram que não foi capaz de melhorar a resposta embrionária ao utilizar o método de congelamento lento.

Recentemente, Batista *et al.*⁽⁷⁾ avaliaram os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 no desenvolvimento e criotolerância de embriões mestiços produzidos *in vitro*. Naqueles embriões cultivados em meio contendo CLA, houve redução da expressão gênica da enzima 1-acilglicerol 3-fosfato o-aciltransferase (AGPAT), resultado que foi associado a outros achados, como a redução do teor de lipídios. No entanto, uma possível melhora na criotolerância embrionária em resposta ao CLA não foi confirmada pelas taxas de eclosão. Esses achados sugerem que a redução do acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos causado pelo CLA, independentemente de ter efeito benéfico na reexpansão após a criopreservação, ainda não foi suficiente para proteger o embrião dos efeitos deletérios da criopreservação⁽⁷⁾.

7. Efeitos da suplementação dietética com CLA na fertilidade

O ácido linoléico é um nutriente necessário para o crescimento e reprodução de não ruminantes, e é um suplemento importante que tem uma ligação direta entre o balanço energético pós-parto e a fertilidade subsequente^(93,94). Estudos de Castañeda-Gutiérrez *et al.*⁽⁹⁵⁾ descreveram que, em vacas leiteiras, a suplementação com CLA *trans-10 cis-12* aumentou os níveis de estradiol, androstenediona e IGF-I, fatores importantes que suportam a foliculogênese. Da mesma forma, Taylor *et al.*⁽⁹⁶⁾ mostraram melhor desempenho de fertilidade 12 semanas antes da lactação e Darwash *et al.*⁽⁹⁷⁾ observaram uma forte correlação entre o tempo da primeira ovulação e o tempo de concepção de vacas leiteiras suplementadas com CLA. Uma das ações benéficas mais conhecidas do CLA é mitigar o balanço energético negativo pós-parto^(98,99). Além disso, o CLA também seria importante para evitar o nascimento prematuro, uma vez que ativa as metaloproteinases, inibindo suas funções, o que previne a ruptura prematura das membranas fetais e o nascimento prematuro⁽⁹⁹⁾. Rodney *et al.*⁽¹⁰⁰⁾ e Rodney *et al.*⁽¹⁰¹⁾, em uma meta-análise, observaram que as gorduras individuais não têm a capacidade de aumentar a fertilidade, mas a investigação do uso do CLA mostrou resultados positivos, porém o número de estudos ainda é insuficiente. Veth *et al.*⁽⁹⁹⁾ avaliaram estudos que indicaram redução no tempo de prenhez, de 151 para 117 dias, quando vacas foram suplementadas com CLA protegido no rúmen. Abolghasemi *et al.*⁽¹⁰²⁾ sugerem que a dieta enriquecida com CLA tem efeitos benéficos, como redução da expressão do receptor endocanabinóide (CNR2) e enzimas que sintetizam amidas de ácidos graxos (NAPEPLD), além de aumento de PTGS2, resultando em aumento da progesterona plasmática e medições durante o início da lactação. Oliveira *et al.*⁽¹⁰³⁾ suplementaram vacas com CLA 18 dias antes do parto e observaram que a gordura sérica e o β -hidroxibutirato foram reduzidos nos dias 1 e 7 pós-parto, resultando em menor prevalência de hipercetonemia no 14º dia pós-parto. Chandler *et al.*⁽¹⁰⁴⁾ observaram que vacas primíparas, quando suplementadas com CLA, apresentaram tendência a aumentar a taxa de concepção no primeiro serviço, levando também a um menor intervalo de partos, corroborando estudos realizados por Gutiérrez *et al.*⁽¹⁰⁵⁾ Csillik *et al.*⁽¹⁰⁶⁾ investigaram o uso de CLA em vacas leiteiras multíparas de alta produção e observaram um aumento na P4 pós-ovulatória, um aumento na fertilidade com uma redução no período do parto até a concepção, um aumento nos níveis plasmáticos de IGF-1 e leptina. Os lipídios presentes na dieta são cruciais para a formação da membrana plasmática dos espermatozoides⁽¹⁰⁷⁾, entretanto os estudos em machos são muito limitados. Abdelatty *et al.*⁽⁵⁸⁾ sugerem que a suplementação com CLA em doses superiores a 0,5% por longo prazo em coelhos machos não é benéfica. Apesar de surtir efeitos benéficos no crescimento, não equilibra os efeitos negativos da fertilidade. Zamora-Zamora *et al.*⁽¹⁰⁸⁾ avaliaram a inclusão de CLA na dieta a 1% de javalis e não observaram diferenças quanto às características do sêmen e perfil de ácidos graxos dos espermatozoides. No geral, a suplementação da dieta com CLA seria uma estratégia importante para melhorar o desempenho reprodutivo de mamíferos domésticos e é um campo que requer mais investigações.

Tabela 1- Compilação dos principais resultados publicados sobre a criopreservação na linha germinativa e embriões utilizando a suplementação com CLA

Referência	Espécime	Espécie	Procedimento de criopreservação	Taxa de viabilidade pós criopreservação	Principais achados
Leão <i>et al.</i> , 2008	Embrião	Bovino	Vitrificação - 100 µM 9c, 11t e 10t, 12c CLA	A suplementação com produção <i>in vitro</i> de CLA aumentou a sobrevivência dos embriões vitrificados e descongelados após 3 horas (80,0%) em comparação com o controle (63,8%).	A suplementação da mídia com CLA <i>cis-9</i> e <i>trans-</i> , 11- e <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> durante IVM e IVC aumentou a taxa de sobrevivência embrionária após o aquecimento.
Pereira <i>et al.</i> , 2008	Embrião	Bovino	Vitrificação - 100 µM 10t, 12c CLA	A adição do isômero <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> na cultura de embrião aumentou a taxa de viabilidade pós congelamento (68,6% / 27,4%).	Os meios contendo CLA diminuíram a deposição de lipídios citoplasmáticos do embrião e melhoraram a resistência do embrião à micromanipulação e criopreservação.
Soares <i>et al.</i> , 2013	Espermatozóide	Bovino	Convencional 50µM, 100µM, 150µM 9c, 11t and 10t, 12c CLA	Não foi observada diferença entre os tratamentos.	O uso do CLA no meio de diluição de espermatozoides bovinos apresentou os maiores valores de velocidade média em 50 µM e maior porcentagem de ingestão de membrana em 100 µM.
Batista <i>et al.</i> , 2014	Embrião	Bovino	Convencional - 100 µM 10t, 12c CLA	Aumento na taxa de re-expansão de embriões cultivados com CLA <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> quando comparados ao controle (56.3 vs. 34.4%). Entretanto, a diferença não foi observada na taxa de incubação (16.5 vs. 14.0%).	O mecanismo pelo qual o <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> CLA reduz o teor de lipídios neutros de embriões produzidos <i>in vitro</i> envolve uma regulação negativa na expressão da enzima 1-acilglicerol-3-fosfato 0-aciltransferase.
Absalón-Medina <i>et al.</i> , 2014	Embrião	Bovino	Vitrificação - 9c,11t e 10t,12c foram testadas a altas(50, 100, and 200 µM) e baixas (15 and 25 µM) concentrações	Maior taxa de sobrevivência após aquecimento e maior contagem de blastômeros.	Embriões cultivados em meio contendo CLA apresentaram maiores taxas de sobrevivência após a criopreservação.
Matos <i>et al.</i> , 2015	Oócito	Bovino	Maturação - 100 µM 10t, 12c CLA - Vitrificação EGIDMSO 10%,	Aumento no desenvolvimento da vitrificação/aquecimento. Redução da permeabilidade da membrana (37% - 42%).	A suplementação de CLA melhora a viabilidade do oócito pós-congelamento.
Teixeira <i>et al.</i> , 2017	Espermatozóide	Suíno	Convencional - 50µM 10t, 12c	Redução significativa da viabilidade após congelamento e descongelamento.	Não foram observadas vantagens sobre a viabilidade e integridade dos espermatozoides pós-descongelamento.
Karimi <i>et al.</i> , 2017	Espermatozóide	Bovino	Convencional - 5g por gavagem com 9c, 11t and 10t, 12c CLA	Baixas taxas em ambos os tratamentos nas semanas 6 e 8, com recuperação na semana 10.	A suplementação de CLA não altera a motilidade progressiva dos espermatozoides em amostras frescas e congeladas / descongeladas.
Carvalho <i>et al.</i> , 2019	Embrião	Bovino	Vitrificação - 100 µM 10t, 12c CLA	Aumento nas taxas de incubação quando adicionado ao período de crescimento.	A suplementação de CLA promove a redução dos níveis de lipídios e melhora a criorresistência.
Dias <i>et al.</i> , 2020	Embrião	Bovino	Congelamento lento -100 µM 10t, 12c CLA	Redução na taxa de blastocistos com taxa de reexpansão de 43%.	O CLA durante o cultivo <i>in vitro</i> não foi capaz de melhorar a produção de embriões e a resposta à criopreservação.

Conclusão

A função do CLA na criopreservação é exercida por dois mecanismos: i) modulação do perfil lipídico da membrana e ii) quantidade de lipídios intracelulares. Adicionalmente, os efeitos da suplementação de CLA na criotolerância de espermatozoides, oócitos e embriões são resumidamente compilados na tabela 1. Na criopreservação de espermatozoides, a evidência sugere que o CLA modula a função espermática principalmente pela modulação do perfil lipídico na membrana. No entanto, os efeitos sobre a criopreservação de espermatozoides são mínimos ou mesmo negativos, especialmente quando suplementados na dieta. Em oócitos e embriões, as evidências sugerem que o CLA atua tanto no nível do perfil lipídico da membrana quanto na quantidade de lipídios intracelulares. Nessas células, as informações da literatura demonstram um efeito benéfico desses ácidos graxos na criopreservação. A suplementação de CLA em oócitos, durante a maturação *in vitro* ou criopreservação, melhorou tanto a viabilidade após o congelamento quanto sua competência de desenvolvimento, representando uma estratégia muito promissora para a produção de embriões mais criotolerantes. Por outro lado, a diminuição do conteúdo lipídico intracitoplasmático observada em embriões cultivados em meio contendo CLA e seu efeito positivo na sobrevivência do embrião após a criopreservação abrem novos caminhos na produção de embriões e criobiologia. Finalmente, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do CLA na criopreservação de gônadas, oócitos, espermatozoides e embriões.

Contribuição do autor

Todos os autores contribuíram para a redação do manuscrito, e todos os autores aprovaram a versão final.

Declaração de inexistência de conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse conhecidos associados a esta publicação e não houve suporte financeiro para este trabalho que pudesse ter influenciado seu resultado.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil). DSF, GAGL, BRN e LAACP receberam bolsa do CNPq, CAPES e FAPEMIG. Os autores também agradecem ao Prof. Dr. Paulo César Pinheiro (DCNAT-UFSJ) pela revisão da versão em língua Inglesa do artigo.

Referências

1. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han, J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res Epub* 2017;1:12-18. Disponível em: [10.1016/j.imr.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001)
2. Pegg DE. Principles of Cryopreservation. In: Wolkers W., Oldenhof H. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2015;3-19. Disponível em: <https://www.springer.com/gp/book/9781493921928>
3. Doyong G, Critser JK. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells *ILAR Journal*, 2000; 41(4): 187-196. Disponível em: [10.1093/ilar.41.4.187](https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187)
4. Lapa M, Marques CC, Alves SP, Vasques MI, Baptista MC, Carvalhais I. Effect of *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reprod Domest Anim*, 2011;46: 904-910. Disponível em: [10.1111/j.1439-0531.2011.01762.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01762.x)
5. Teixeira SMP, Chaveiro AEN, Silva JFM. Effect of *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid on boar semen quality after cryopreservation. *Animal Reproduction*, 2017;14(2):400-405. Disponível em: [10.21451/1984-3143-AR831](https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR831)
6. Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; Horta, A.E.; Portugal, P.V.; Bessa, R.J.; 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid. *Anim Reprod Sci*, 2007; 98: 293-301. Disponível em: DOI: [10.1016/j.anireprosci.2006.03.015](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.015)
7. Batista RITP, Raposo NRB, Campos-Junior PHA, Pereira MM, Camargo LSA, Carvalho BC, Gama MAS, Viana JHM. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro- produced crossbred bovine embryos. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2014;5:33. Disponível em: [10.1186/2049-1891-5-33](https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-33)
8. Bessa RJB, Santos-Silva J, Ribeiro JMR. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, 2000; 63: 201-211. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00117-7)
9. Pariza MW, Ashoor SH, Chu FS, Lund DB. Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters, Amsterdam*, 1979; 7: 63-69. Disponível em: DOI: [10.1016/s0304-3835\(79\)80097-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(79)80097-x)
10. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 1997; 32: 853-858. Disponível em: DOI: [10.1007/s11745-997-0109-x](https://doi.org/10.1007/s11745-997-0109-x)
11. Dugan MER, Aalhus JL, Jeremiah LE, Kramer JKG, Schaefer AL. The effects of feeding conjugate linoleic acid on subsequent pork quality. *Canadian Journal of Animal Science*, 1999; 79: 45-51. Disponível em: <https://doi.org/10.4141/A98-070>
12. Bee G. Dietary conjugated linoleic acids clatter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows. 1997. *Journal of Nutrition*, 2000; 130: 2292-2298.
13. Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebo A, Bauman DE. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. *American Journal Physiology Regulatory Comparative Physiology*, 2000; 278: 179-84. Disponível em: DOI: [10.1152/ajpregu.2000.278.1.R179](https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.1.R179).
14. Sebedio JL, Gnaedig S, Chardigny JM. Recent advances in conjugated linoleic acid research. *Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care*, 1999; 2(6): 499-506.
15. Bauman DE, Griinari JM. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 2001; 70: 15-29. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0301->

[6226\(01\)00195-6](#)

16. Kepler CR, Hirons KP, McNeill JJ, Tove SB. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 1966; 241: 1350-1354.
17. Harfoot CG, Halzlewood GP. Lipid metabolism in the rumen. Hobson, P.N. (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*, New: Elsevier, 1988: 527.
18. Griinari JM, Bauman DE. Biosynthesis of CLA and incorporation into milk fat. Yurawecz, M. P. et al., *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, AOCS Press, Champaign, IL, 1999: 180-200. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2285>
19. Coakley M, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Dever R, Stanton C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2003; 94: 138-145. Disponível em: DOI: [10.1046/j.1365-2672.2003.01814.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01814.x)
20. Ando A, Ogawa J, Kishino S, Shimizu S. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. *Microbial and Enzyme Technology*, 2004 35: 40-45. Disponível em: DOI: [10.1016/j.enzmictec.2004.03.013](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.013)
21. Stewart CS, Flynt HJ, Bryant MP. The rumen bacteria. in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Blackie Academic and Professional, New York, NY, 1997; 10-72.
22. Griinari JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL, Nurmela KV. Trans-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1998; 81: 1251-1261. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75686-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75686-3)
23. Chouinard PY, Bauman DE, Corl BA, Baumard LH, McGuire MA, Giesy JG. An update on conjugated linoleic acid. *Cornell Nutrition Conference Feed Manufacturers*, 1999; 93-101.
24. Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ desaturase. *Journal Nutrition*, 2000; 130(9): 2285-2291. Disponível em: DOI: [10.1093/jn/130.9.2285](https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2285)
25. Perfield JW, Bernal-Santos G, Overton TR, Bauman DE. Effects of dietary supplementation of rumen protected conjugated linoleic acid dairy cows during established lactation. *Journal of Dairy Science*, 2002; 85: 2609-2617. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74346-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74346-4)
26. Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Philips BS, Bauman DE. The role of delta-9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001; 12: 622-630. Disponível em: DOI: [10.1016/s0955-2863\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00180-2)
27. Kay JK, Mackle TR, Auldust MJ, Thomson NA, Bauman DE. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *Proceedings of New Zealand Society Animal Production*, 2002; 62: 12-15.
28. Lee KN, Pariza MW, Ntambi JM. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998; 248: 817-821. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8994>
29. Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, Cook ME, Sih CJ, Pariza MW. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2000; 1486: 285-292. Disponível em: DOI: [10.1016/s1388-1981\(00\)00074-3](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00074-3)
30. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal Clin Invest*, 2002; 109: 1125-1131. Disponível em: doi: [10.1172/JCI15593](https://doi.org/10.1172/JCI15593)

31. Baumgard LH, Matitashvili E, Corl BA, Dwyer DA, Bauman DE. *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*, 2002; 85: 2155. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74294-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74294-X)
32. Peterson DG, Matitashvili EA, Bauman DE. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J Nutr*, 2003; 133: 3098-3102. Disponível em: DOI: [10.1093/jn/133.10.3098](https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3098)
33. Granlund L, Pedersen JI, Nebb HI. Impaired lipid accumulation by *trans*-10 *cis*-12 during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1687:11-22. Disponível em: DOI: [10.1016/j.bbali.2004.08.018](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2004.08.018)
34. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, 2008; 9:267. Disponível em: DOI: [10.1007/s10561-008-9075-2](https://doi.org/10.1007/s10561-008-9075-2)
35. Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011; 93: 30-36. Disponível em: DOI: [10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002)
36. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972; 181:175(4023):720-31. Disponível em: DOI: [10.1126/science.175.4023.720](https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720)
37. Watson H. Biological membranes. *Essays Biochem*, 2015; 15(59): 43-69. Disponível em: doi: [10.1042/bse0590043](https://doi.org/10.1042/bse0590043)
38. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 2006; 12: 779-796. Disponível em: DOI: [10.1016/s1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61091-7)
39. Juchem SO, Cerri RLA, Villaseñor M, Galvão KN, Bruno RGS, Rutigliano HM, Depeters EJ, Silvestre FT, Thatcher WW, Santos JEP. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. *Reprod Dom Anim*, 2010; 45: 55-62. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1614>
40. Rahme LSTR. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2012. In: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-8UHG53>
41. Leite AC, Andrade VB, Silva EBM, Borges AM. Effect of conjugated linoleic acid addition in in vitro culture medium in F1 Holstein X Zebu embryo survival post vitrification. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 2017; 69 (6): 1385-1392. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9238>.
42. Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Cabral EC, Coelho MB, Ferreira CR, Eberlin MN, Accorsi MF, Nogueira E, Mingoti GZ. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology*, 2015; 84: 127-136. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.023>
43. Carvalho BP, Queirós Costa FQ, Detoni D, Rosa FB, Dias AJB. Use of conjugated linoleic acid (*trans*-10, *cis*-12) to cultivate bovine embryos: effect on cryoresistance and lipid content. *R. Bras. Zootec.*, 2019; 48. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/rbz4820180322>
44. Hess RA, França LR. 2007 Spermatogenesis and the cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (ed. Cheng, C.Y.), 2007; 1-15. Disponível em: DOI: [10.1007/978-0-387-09597-4_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1)
45. Siqueira JB, Guimarães JD, Costa EP, Henry M, Torres CAA, Silva MVGB, Silveira TS. Relação da Fertilidade de Sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática. *Revista Brasileira de*

Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science, 2007; 36: 387-395

46. Bedford JM, Hoskins DD. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming, G. E. Marshall's Physiology of Reproduction, London, Churchill Livingstone, 1990;2: 379-568.

47. Albert DH, Coniglio JG. Metabolism of eicosa-11,14-dienoic acid in rat testes. Evidence for delta8-desaturase activity. Bioch Biophys Acta, 1977; 21;489(3):390-6.

48. Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. Journal of Membrane Biology, 1998;165: 1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002329900415>

49. White I. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. Reproduction, Fertility and Development, 1993; 5: 639-658. Disponível em: DOI: [10.1071/rd9930639](https://doi.org/10.1071/rd9930639)

50. Am-In N, Kirkwood R, Techakumphu M, Tantasuparuk W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. Theriogenology, 2011; 75: 897-903. Disponível em: [10.1016/j.theriogenology.2010.10.032](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.032)

51. Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. Lipids, 2000; 35: 149-154. Disponível em: DOI: [10.1007/BF02664764](https://doi.org/10.1007/BF02664764)

52. Samadian F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. Animal, 2010; 4: 2017-2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731110001308>

53. Gholami H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli MH. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. Theriogenology, 2010; 74: 1548-1558. Disponível em: DOI: [10.1016/j.theriogenology.2010.06.025](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.025)

54. Moallem U, Neta N, Zeron Y, ZAchut M, Roth Z. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. Theriogenology, 2015; 83: 1110-1120. Disponível em: DOI: [10.1016/j.theriogenology.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.008)

55. Surai P, Noble R, Sparks N, Speake B. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. Journal of Reproduction and Fertility, 2000; 120: 257-264.

56. Rooke JA, Shao CC, Speake BK. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. Reproduction, 2001; 121: 315-322. Disponível em: DOI: [10.1530/rep.0.1210315](https://doi.org/10.1530/rep.0.1210315)

57. Stulnig TM, Huber J, Leitinger N, Imre EM, Angelisová P, Nowotny P, Waldhäusl W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. Journal of Biological Chemistry, 2001; 276: 37335-37340. Disponível em: doi: [10.1074/jbc.M106193200](https://doi.org/10.1074/jbc.M106193200)

58. Abdelatty AM, Badr OAM, Mohamed SA, Khattab MS, Dessouki SM, Farid OAA, Elolimy AA, Sakr OG, Elhady MA, Mehesen G, Bionaz M. Long term conjugated linoleic acid supplementation modestly improved growth performance but induced testicular tissue apoptosis and reduced sperm quality in male rabbit. PLoS ONE, 2020; 15(1). Disponível em: DOI: [10.1371/journal.pone.0231280](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231280)

59. Karimi R, Towhidi A, Zeinoaldini S, Rezayazdi K, Mousavi M, Safari H, Martinez-Pastor F. Effects of supplemental conjugated linoleic acids (CLA) on fresh and post-thaw sperm quality of Holstein bulls. Reprod Dom Anim., 2017; 1-9. Disponível em: DOI: [10.1111/rda.12932](https://doi.org/10.1111/rda.12932)

60. Maldjiana A, Pizzi F, Gliozzic T, Cerolinibi S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid

composition during cryopreservation of boar sêmen. *Theriogenology*, 2005; 63: 411-421. Disponível em: DOI: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.021](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.021)

61. Vasquez JM, Roldan ERS. Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the novo formation of phosphatidylcholine. *Mol Rep*, 1997; 47: 105-112. Disponível em: DOI: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<105::AID-MRD14>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<105::AID-MRD14>3.0.CO;2-0)

62. Pérez-Pé R, Cebrian-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Semen plasma protein prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa, *Theriogenology*, 2001; 56: 425-434. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00574-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00574-X)

63. Hossain M.D.S, Tareq K, Hammano H, Tsujii KMA. Effect of fatty acids o boar sperm motility, viability and acrosome reaction, *Reprod. Med. Biol.*, 2007; 6: 235-239. Disponível em: doi: [10.1111/j.1447-0578.2007.00191.x](https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2007.00191.x)

64. Takahashi T, R. Itoh H. Nishinomiya M, Katoh N. Manabe, Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability, *Reprod. Domest. Anim*, 2012; 47: 92-97. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01806.x>

65. Kaeoket K. Cryopreservation of boar spermatozoa: an important role of antioxidants. Katkov I (Ed.). *Current Frontiers in Cryopreservation*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012; 139-164.

66. Soares MP, Brandelli A, Celeghini ECC, Arruda RP, Rodriguez SAF. Effect of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers of conjugated linoleic acid on the integrity and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 2013; 67: 102-105. Disponível em: DOI: [10.1016/j.cryobiol.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.003)

67. Verstegan J, Iguer-Quada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 2002; 57: 149-179. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).

68. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the ovary and mammalian follicles. *Plos One*, 2013; 8. Disponível em: DOI: [10.1371/journal.pone.0055578](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055578)

69. Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod Fert*, 1999; 116: 373-378. Disponível em: DOI: [10.1530/jrf.0.1160373](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160373)

70. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation on women. *N Engl J Med*, 2017; 377: 1657-1665. Disponível em: DOI: [10.1056/NEJMra1614676](https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676)

71. De Santis L, Coticchio G, Paynter S, Albertini D, Hutt K, Cino I. Permeability of human oocytes to ethylene glycol and their survival and spindle configurations after slow cooling cryopreservation. *Hum Reprod.*, 2007; 22: 2776-2783. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem240>

72. Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril*, 2009; 91: 1023-34. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.076>

73. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 2017; 81 :96-102. Disponível em: DOI: [10.1016/j.theriogenology.2013.09.011](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.011)

74. Pereira RM, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM. Influência da suplementação de ácido araquidônico e inibição da ciclooxigenase / lipoxigenase no desenvolvimento de embriões bovinos precoces. *Rev Bras. Zoot*, 2006; 35: 1-6.

75. Isachenko V, Isachenko E, Michelmann HW, Alabart JL, Vazquez I, Bezugly N, Nawroth F. Lipolysis and

ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anat Histol Embryol*, 2001; 30:333-338. Disponível em: DOI: [10.1046/j.1439-0264.2001.00339.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2001.00339.x)

76. Silva-Santos, K. C., Ferreira, C. R., Santos, G. M. G., Eberlin, M. N., Siloto, L. S., Rosa, C. O., Marcantonio, T. N., and Seneda, M. M. MALDI-MS lipid profiles of oocytes recovered by ovum pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus_taurus* with high vs low oocyte yields. *Reprod. Domest. Anim.* 2014, 49, 711-718. Disponível em: doi: [10.1111/rda.12352](https://doi.org/10.1111/rda.12352)

77. Aardema, H., Vos, P. L. A. M., Lolicato, F., Roelen, B. A. J., Knijn, H. M., Vaandrager, A. B., Helms, J. B., and Gadella, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol. Reprod.* 2011, 85, 62-69. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088815>

78. Christina R, Ferreira AF, Alan K, Jarmusch A, Valentina Pirro A, Clint M, AlfaroA, Andres F, Gonzalez-Serrano BE, Heiner Niemann B, Matthew B, Wheeler C, Rathnaweera AC, Rabel C, Judy E, Hallett D, Rebecca Houser D, Annemarie Kaufman D, Graham Cooks RA. Ambient ionisation mass spectrometry for lipid profiling and structural analysis of mammalian oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015, 27, 621-637. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/RD14310>.

79. Matos JE, Marques CC, Moura TF, Baptista MC, Horta AEM, Soveral G, Pereira RMLN. Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Biology and Endocrinology*, 2015; 13:60. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0059-3>

80. Almiñana C, Cuello C. What is new in the cryopreservation of embryos? *Anim. Reprod.*, 2015; 12(3): 418-427.

81. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 2011; 141: 1-19. Disponível em: DOI: [10.1530/REP-10-0236](https://doi.org/10.1530/REP-10-0236)

82. Pollard JW, Leibo SP. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1993; 39: 287.

83. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Zin ZK, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 1995; 42: 141-152.

84. Seidel Jr GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 2006; 65: 228-235. Disponível em: DOI: [10.1016/j.theriogenology.2005.09.025](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.025)

85. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speak BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil*, 2000; 118: 163-170.

86. Charpigny G, Guesnet P, Marquant-LeGuiene B, Heyman Y, Mermillod P, Humblot P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. *Les actes du BRG*, 2003; 4: 159-172.

87. Mingoti GZ, Caiado-Castro VS, Méo SC, Barretto LS, Garcia JM. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote*, 2009; 17: 321-328. Disponível em: DOI: [10.1017/s0967199409005450](https://doi.org/10.1017/s0967199409005450)

88. Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 2003; 68: 236-243. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>

89. Stein A. Decreasing variability in your cell culture. *Biotechniques*, 2007; 43: 228-229. Disponível em: DOI: [10.2144/000112561](https://doi.org/10.2144/000112561)

90. Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 2001; 40: 283-298. Disponível em: [10.1016/s0163-7827\(01\)00008-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(01)00008-x)
91. Sehat N, Kramer JK, Mossoba MM, Yurawecz MP, Roach JA, Eulitz K. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences *Lipids*, 1998; 33: 963-971. Disponível em: DOI: [10.1007/s11745-998-0293-8](https://doi.org/10.1007/s11745-998-0293-8)
92. Dias, R.L.O.; Leme, L.O.; Sprígigo, J.F.W.; Pivato, I; Dode, M.A.N. 2020. Effect of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos. *Reprod Dom Anim.*, 2020; 55:11–20. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13579>
93. NRC. *Nutrient Requirements of laboratory Animals*. 4th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC, 1995. Disponível em: DOI: [10.17226/4758](https://doi.org/10.17226/4758)
94. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000; 60-61: 449-457. Disponível em: DOI: [10.1016/s0378-4320\(00\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00076-2)
95. Castañeda-Gutiérrez E, Benefield BC, Veth MJ, Santos NR, Gilbert RO, Butler WR, Bauman DE. 2007 Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2007; 90: 4253 - 4264. Disponível em: DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0117>
96. Taylor CG, Zahradka P. Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004; 79(6): 1164S–1168S. Disponível em: DOI: [10.1093/ajcn/79.6.1164s](https://doi.org/10.1093/ajcn/79.6.1164s)
97. Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA. The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle *Anim. Sci.*, 1997; 65: 9-16. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.1017/S1357729800016234>
98. Griinari JM, Bauman DE. Milk fat depression: concepts, mechanisms and management applications. In: Sejrsen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M. O. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic, 2006; 389–417.
99. Veth MJ, Bauman DE, Koch W, Mann GE, Pfeiffer AM, Butler WR. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2009; 92: 2662–2669. Disponível em: DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1845>
100. Rodney RM, Celi P, Scott W, Breinhild K, Lean IJ. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *Dairy Sci.* 98:1–20 © American Dairy Science Association®, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9528>
101. Rodney RM, Celi P, Scott W, Breinhild K, Lean IJ. Effects of nutrition on the fertility of lactating dairy cattle Author links open overlay panel. *Journal of Dairy Science* Volume 101, Issue 6, June 2018, Pages 5115-5133 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14064>
102. Abolghasemi A, Dirandeh E, Ansari pirsaraei Z, Shohreh B. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) supplementation alters the expression of genes involved in the endocannabinoid system in the bovine endometrium and increases plasma progesterone concentrations, *Theriogenology* (2016), Disponível em: doi: [10.1016/j.theriogenology.2016.05.003](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.003).
103. Oliveira RC, Pralle RS, de Resende LC, Nova CHPC, Caprarulo V, Jendza JA, et al. (2018) Prepartum supplementation of conjugated linoleic acids (CLA) increased milk energy output and decreased serum fatty acids and β -hydroxybutyrate in early lactation dairy cows. *PLoS ONE* 13(5): e0197733. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197733>
104. Tawny L, Chandler A, Robert T, Fugatea, Joshua A, Jendza B, Arnulf Troescher C, Heather M. White

A. Conjugated linoleic acid supplementation during the transition period increased milk production in primiparous and multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 224 (2017) 90–103. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.008>.

105. Castaneda-Gutiérrez E, Overton TR, Butler WR, Bauman DE. Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. *J. Dairy Sci.* 2005; 88, 1078–1089. Disponível em: DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72775-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72775-2)

106. Z. Csillik,*1 V. Faigl,† M. Keresztes,† E. Galamb,‡ H. M. Hammon,§ A. Tröscher,* H. Fébel,# M. Kulcsár,† F. Husvéth,‡ Gy. Huszenicza,† and W. R. Butler□. Effect of pre- and postpartum supplementation with lipid-encapsulated conjugated linoleic acid on reproductive performance and the growth hormone–insulin-like growth factor-I axis in multiparous high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1–11 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12124>.

107. Gliozzi TM, Zaniboni L, Maldjian A, Luzi F, Maertens L, and Cerolini S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*. 2009; 71(6), pp. 910–919. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.022>

108. Zamora-Zamora V, Figueroa-Velasco JL, Cordero-Mora JL, Nieto-Aquino R, García-Contreras ADC, Sánchez-Torres MT. Conjugated linoleic acid supplementation does not improve boar semen quality and does not change its fatty acid profile. *Veterinaria México*. 2017; 4(3), pp. 1–15. Disponível em: doi: [10.21753/vmoa.4.3.387](https://doi.org/10.21753/vmoa.4.3.387).

109. Absalón-Medina VA, Bedford-Guaus SJ, Gilbert RO, Siqueira LC, Eposito G, Schneider A, Cheong SH, Butler WR. The effects of conjugated linoleic acid isomers *cis-9,trans-11* and *trans-10,cis-12* on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. *Journal of Dairy Science* Volume 97, Issue 10, October 2014, Pages 6164–6176. Disponível em: DOI: [10.3168/jds.2013-7719](https://doi.org/10.3168/jds.2013-7719)