

*Revista Electrónica Nova Scientia*

**Perfil metabólico de isómeros de Ácido Linoleico  
Conjugado y calidad de ovocitos en ovejas de pelo**  
**Metabolic profile of conjugated linoleic acid  
isomers and oocyte quality in hair ewes**

**Víctor Meza-Villalvazo<sup>1</sup>, Alfredo Trejo Córdova<sup>1</sup>, Héctor  
Magaña Sevilla<sup>2</sup>, Carlos Sandoval Castro<sup>3</sup>, Alfonso Chay-  
Canul<sup>4</sup>, Adriana Cavazos Garduño<sup>5</sup> y Cecilia Martínez-  
Sánchez<sup>6</sup>**

---

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán

<sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de  
Yucatán, Mérida, Yucatán

<sup>4</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de  
Tabasco, Tabasco

<sup>5</sup>Unidad de investigación y desarrollo de alimentos, Instituto Tecnológico de  
Veracruz, Veracruz, Veracruz-Llave

<sup>6</sup>Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Oaxaca

---

**México**

*Hector Magaña Sevilla.* E-mail: [Hectorms68@hotmail.com](mailto:Hectorms68@hotmail.com)

## Resumen

Los ácidos grasos poliinsaturados sufren modificaciones a nivel ruminal dando origen a los isómeros conjugados del ácido linoléico (CLA), el cual, bajo condiciones *in vitro* ha demostrado mejorar la resistencia a la manipulación y supervivencia de los embriones. Sin embargo, bajo estas condiciones no está expuesto al metabolismo del animal, lo cual pudiera modificar su potencial fisiológico, resultando necesario estudiar los aspectos intrínsecos del animal consumiendo dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de los isómeros de CLA de mayor importancia biológica en líquido ruminal bajo condiciones *in vitro*, la presencia de estos en líquido folicular, plasma sanguíneo y la calidad de ovocitos en borregas Pelibuey *in vivo*. El estudio se realizó en dos fases: fase 1, se formularon tres dietas isoenergéticas e isoproteicas, con tres niveles de inclusión de aceite de maíz en la dieta (0 %, 3 % y 6 %), las cuales fueron incubadas en medio de cultivo con fluido ruminal por 24 h. fase 2, se utilizaron 21 ovejas de la raza Pelibuey con un peso vivo de  $35.7 \pm 1.92$  kg, distribuidas en tres grupos ( $n = 7$ ) y alimentadas con las dietas descritas en la fase 1 por un periodo de 28 días, los ciclos estrales fueron sincronizados con tres dosis de PGF $2\alpha$  y un dispositivo intravaginal impregnado de FGA por 12 días. El día ~29 del experimento los animales se sacrificaron, los ovocitos se aspiraron mediante punción a partir de folículos  $\geq 2.00$  mm, clasificándose en excelente, buena, regular y mala calidad, la determinación de la proporción de ácidos grasos en líquido ruminal, folicular y plasma sanguíneo fue determinada mediante cromatografía de gases. Los ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3) en líquido ruminal y sangre, no fueron afectados por el nivel de aceite, en líquido folicular el C16:0, C18:0 y C18:3 ( $P \leq 0.01$ ) disminuyen de manera lineal conforme aumentó el nivel de aceite en la dieta. Los isómeros *Cis-9*, *Trans-11* ( $P \leq 0.05$ ) y *Trans-10*, *Cis-12* ( $P \leq 0.001$ ) en líquido ruminal presentaron un efecto lineal, y en la sangre un efecto cuadrático ( $P \leq 0.014$ ) y lineal ( $P \leq 0.004$ ) respectivamente. En líquido folicular el *Cis-9*, *Trans-11* (6 a 12 %) y *Trans-10*, *Cis-12* (2 a 4%) aumenta de forma lineal su presencia conforme incrementó el nivel de aceite en la dieta. La calidad de los ovocitos mejoró conforme se incrementó el nivel de aceite de maíz en la dieta. En conclusión la adición del 6% de aceite de maíz en la dieta de ovejas Pelibuey, aumenta la presencia de los isómeros *Cis-9*, *Trans-11* y *Trans-10*, *Cis-12* en líquido ruminal y folicular, favoreciendo la calidad de los ovocitos.

**Palabras clave:** CLA, biohidrogenación, líquido folicular, ovocitos, ovejas de pelo

Recepción: 22-10-2013

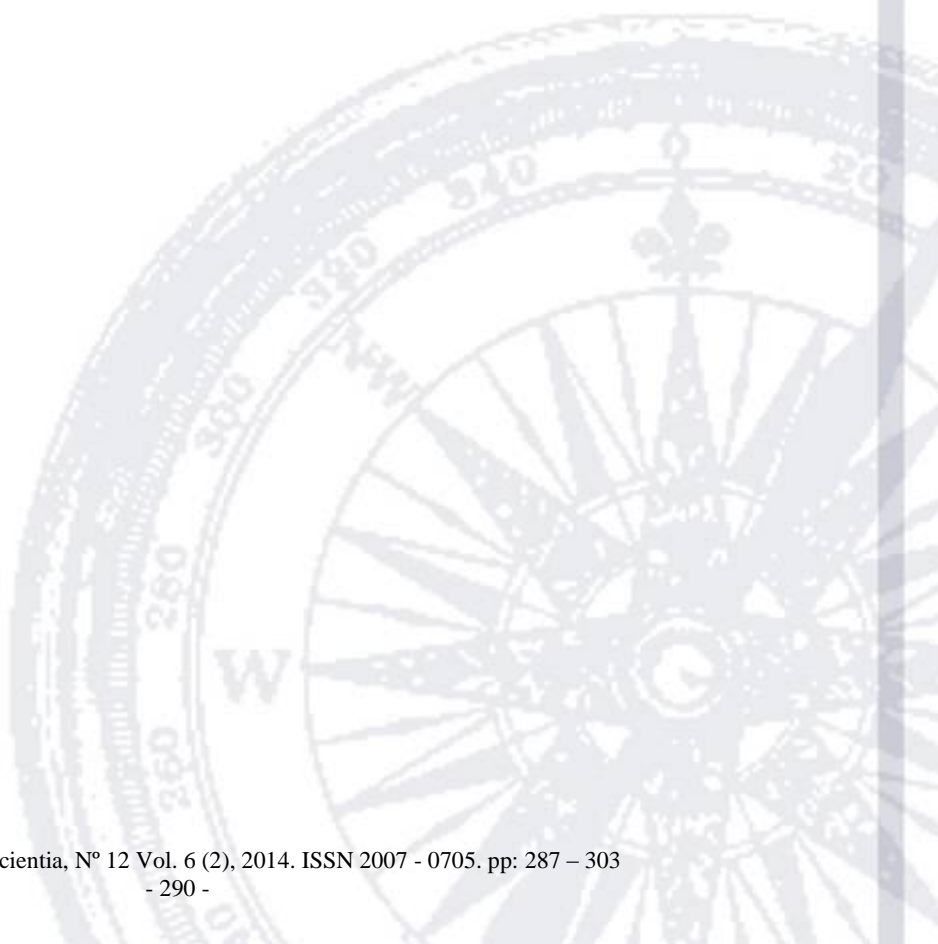
Aceptación: 14-05-2014

## Abstract

Polyunsaturated fatty acids are modified in rumen, given rise to isomers of conjugated linoleic acid (CLA), which, under *in vitro* conditions, has been shown to improve the resistance to manipulation and embryo survival. However, under these conditions is not exposed to the metabolism of the animal, which could affect their physiological potential, being necessary the study of the intrinsic aspects of the animal consuming, diets rich in polyunsaturated fatty acids. The aim of the present work was to determine the presence of most biologically important CLA isomers in rumen fluid *in vitro* conditions, the presence of these in blood, follicular fluid and oocyte quality of Pelibuey ewes *in vivo*. The study was conducted in two phases: Phase 1, three isonegetic and isoproteic diets were formulated including three levels of corn oil in the diet (0 %, 3% and 6%), which were incubated in a culture medium with ruminal fluid for 24 h. Phase 2, Twenty one Pelibuey ewes, with a live weight of  $35.7 \pm 1.92$  kg, were divided into three groups ( $n = 7$ ) and fed with the diets described in phase 1 for a period of 28 days, estrous cycles were synchronized with three applications of PGF $2\alpha$  and Flourogestone acetate (FGA) impregnated intravaginal device for 12 days. At the day 29 of the experiment the animals were slaughtered, oocytes were aspirated by puncture from follicles  $\geq 2.00$  mm and classified as excellent, good, fair and poor quality, the determination of proportion of fatty acid in rumen fluid and blood plasma follicular blood was determined by gas chromatography. The fatty acids (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 and 18:3) in rumen fluid and blood were unaffected by the oil level, in follicular fluid, C16:0, C18:0 and C18: 3 ( $P \leq 0.01$ ) decrease linearly as the oil level increased in the diet. The isomers *Cis* -9, *Trans* -11 ( $P \leq 0.05$ ) and *Trans* -10, *Cis* -12 ( $P \leq 0.001$ ) in ruminal fluid showed a linear trend, and plasma blood a quadratic effect ( $P \leq 0.014$ ) and linear ( $P \leq 0.004$ ) respectively.

In the follicular fluid *Cis* -9, *Trans* -11 (6 to 12 %) and *Trans* -10, *Cis*-12 (2 to 4 %) increases linearly as increased the oil level in the diet. The oocyte quality improved as increased the level of corn oil in the diet. The addition of 6% of corn oil in the diet of Pelibuey ewes increases the presence of the *Cis* -9, *Trans* -11 and *Trans* -10, *Cis* -12 isomers in rumen and follicular fluid and improve the quality of oocytes.

**Keywords:** CLA, biohidrogenation, follicular liquid, oocytes, tropical hair sheep



## Introducción

La suplementación a rumiantes con lípidos en especial aquellas fuentes ricas en Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) ha demostrado un efecto positivo sobre varios aspectos productivos del animal como son: dinámica folicular, perfiles y cambios hormonales, calidad ovocitaria y desarrollo embrionario (Fuston, 2004). Sin embargo, estos sufren algunas modificaciones a nivel ruminal como la biohidrogenación, que dan origen a una serie de isómeros del ácido linoleico, denominados en su conjunto “Acido Linoleico Conjugado (CLA por sus siglas en ingles) y que han demostrado poseer gran variedad de efectos benéficos (Weiss *et al.*, 2004), tanto en modelos animales como en el ser humano, en algunos tipos de cáncer, obesidad, diabetes, inflamación, inmunodeficiencia, patología cardiovascular (Roche *et al.*, 2001; Belury, 2002). El CLA se conforma por varios isómeros, el predominante es el *cis-9, trans 11*, el cual constituye 80 a 90% CLA presente en los lípidos, sin embargo, mediante el uso de suplementos éste perfil puede modificarse para aumentar las concentraciones de otros isómeros cómo el *trans-10, cis-12*. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en emplear dichos suplementos para aumentar el contenido de CLA en leche (Kevin *et al.*, 2009), y carne (Schlegel *et al.*, 2012). También se ha suplementado a vacas productoras de leche con CLA, en diferentes proporciones de sus isómeros, con el fin de mejorar sus índices reproductivos (Castañeda-Gutierrez *et al.*, 2007; Veth *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2010). En condiciones *in vitro* el CLA mejora la resistencia a la micromanipulación y criopreservación, disminuye la deposición citoplásmica de lípidos e incrementa la supervivencia y calidad de los embriones (Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Lapa *et al.*, 2011). También existe evidencia de un posible efecto del CLA sobre la proporción macho: hembra de embriones producidos *in vitro* (Gomez *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante resaltar que bajo condiciones *in vitro* el CLA no está expuesto al metabolismo propio del animal, factor que pudiera condicionar su efecto biológico. Es necesario estudiar los aspectos intrínsecos del animal cuando son suplementados con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que adicionalmente se produce CLA endógeno y ambas fuentes tienen influencia sobre la composición de algunos fluidos de importancia biológica para la reproducción como son líquido folicular y plasma sanguíneo, los cuales pueden impactar sobre la calidad de los ovocitos y su subsecuente desarrollo a estadios embrionarios avanzados. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de los isómeros de CLA de mayor importancia biológica en líquido ruminal bajo condiciones *in vitro*, la presencia de estos en sangre y líquido folicular y la

calidad de ovocitos en borregas Pelibuey *in vivo*, con tres niveles de inclusión de aceite de maíz en la dieta.

## **Materiales y Metodología**

El presente estudio se realizó en la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, ubicada en las coordenadas geográficas. Latitud Norte 18°04'52", Longitud Oeste 96°07'07" y una altura de 20 msnm.

El estudio se dividió en dos fases:

### ***Fase 1: (Determinación de isómeros de CLA en líquido ruminal en condiciones in vitro)***

#### ***Dietas***

Se formularon 3 dietas isocalóricas (8.9 MJ/kg de MS) e isoproteicas (10.5 % PC/ kg de MS), con tres niveles de inclusión de aceite de maíz (0, 3, y 6 %) en base a materia seca. Las dietas fueron formuladas para hembras adultas de 35 kg de peso vivo y una ganancia diaria de peso de 80 g (AFRC, 1993).

#### ***Determinación in vitro***

Las dietas fueron incubadas por triplicado en botellas de vidrio en medio de cultivo (Menke y Steingass, 1988) con fluido ruminal en una relación de 70:30 respectivamente. 500 mg de la dieta fue incubada por 24 h (Theodoruo *et al.*, 1994), posteriormente a este tiempo cada frasco se filtró a través de papel filtro de peso conocido utilizando una bomba de vacío. El líquido resultante del proceso de filtrado fue almacenado en frascos de vidrio debidamente tapados e identificados, para su posterior análisis.

### ***Fase 2 (Presencia de CLA en líquido folicular y calidad ovocitaria)***

#### ***Animales, manejo y alimentación***

Se utilizaron 21 ovejas Pelibuey adultas con una condición corporal de  $2.60 \pm 0.30$  puntos al inicio del experimento de acuerdo a la escala de 1 a 5 (Russel *et al.*, 1969) y un peso vivo de  $35.70 \pm 1.92$  kg, las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos ( $n = 7$ ) y mantenidas

en confinamiento por un periodo de 28 días y alimentadas con 1kg/animal/día de las dietas antes descritas.

### ***Sincronización de celos***

Los ciclos estrales fueron sincronizados con PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse, Pfizer®) en el día cero (inicio del experimento), seguido por una segunda aplicación el día siete, en los días ocho y nueve, se detectaron celos utilizando un macho vasectomizado, sobre celo detectado el día 14 se aplicó una tercera dosis de prostaglandina acompañado por la inserción de esponjas intravaginales impregnadas de FGA por 12 días (Chronogest CR Intervet).

### ***Muestras sanguíneas***

Las muestras sanguíneas fueron colectadas el día 28 (~ 24 h antes del sacrificio de los animales), mediante punción yugular (10 ml) con tubos vacutainer con 10% EDTA, una vez tomadas las muestras se transportaron a laboratorio, fueron centrifugadas a 2000 RPM por 10 m, el plasma fue extraído y conservado a -20 °C hasta su análisis.

### ***Obtención y clasificación de ovocitos***

Veinticuatro h posteriores al retiro de la esponja intravaginal las hembras fueron expuestas a intervalo de 4 h a un macho vasectomizado, conforme las hembras presentaron celo se sacrificaron para la recuperación de los ovarios, los cuales fueron colocados en una bolsa de sellado hermético con 200 ml de suero fisiológico (Solución Hartmann, Pisa). Se aspiraron todos los folículos  $\geq 2$  mm con una jeringa de 5 cc y aguja de calibre 18  $\times$  1½. El contenido folicular colectado fue vertido en una caja Petri de 100 mm, la clasificación de la calidad ovocitaria se realizó con un microscopio de contrastes de fase (Leica modelo DM 300) en cuatro categorías según lo descrito por Patricio *et al.* (2003):

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

#### 4.-Mala: ovocitos desnudos y ooplasmas irregulares.

Una vez clasificados los ovocitos, se retiraron del líquido folicular, el cual fue vertido en microtubos de 1.0 ml debidamente etiquetados y congelados hasta su análisis.

#### ***Extracción y metilación de los lípidos***

Se utilizaron muestras por triplicado, para la extracción de los ácidos grasos, siguiendo el método de aislamiento y purificación (Lin *et al.*, 1995). Todos los lípidos extraídos fueron resuspendidos en cloroformo (Ma *et al.*, 1999), la metilación se realizó mediante el método descrito por Herman-Lara *et al.* (2012). Los ácidos grasos metilados fueron determinados por cromatografía de gases (HP Model 6890) equipado con columna capilar HP-INNOWAX (60 mx 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m). El programa de temperaturas inició con una 210 °C, la cual se mantuvo por 3 min, posteriormente se incrementó hasta 230 °C a una tasa de 2°C por minuto y finalmente ésta temperatura se mantuvo 15 minutos adicionales, utilizando el nitrógeno como gas acarreador.

#### ***Análisis estadístico***

Los datos de ácidos grasos presentes en líquido ruminal, sangre y líquido folicular fueron analizados por ANOVA usando el procedimiento GLM de SPSS para Windows versión 15.0, la calidad de los ovocitos fue analizada mediante una prueba de Chi-cuadrada con el programa estadístico Statistic (1996).

#### **Resultados:**

Los ácidos grasos presentes en líquido ruminal después de 24 h de incubación se presentan en el Cuadro 1. Las proporciones de 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3 no fueron afectados por el nivel de aceite en la dieta. El *Cis-9*, *Trans-11* presenta un incremento de 31.23 a 97.32 mg/g (lineal  $P \leq 0.05$  y cuadrático  $P \leq 0.040$ ) conforme aumenta el nivel de aceite en la dieta. Este efecto se presenta de forma lineal ( $P \leq 0.001$ ) para el isómero *Trans-10*, *Cis-12*.



**Cuadro 1.** Proporción de ácidos grasos (mg/g) en líquido ruminal bajo condiciones *in vitro*

Ácidos Grasos	Tratamiento			Contraste	
	AM0	AM3	AM6	Lineal	Cuadrático
<b>C 14:0</b>	11.45 ± 0.74 <sup>a</sup>	12.48 ± 0.72 <sup>b</sup>	13.53 ± 1.32 <sup>c</sup>	0.046	NS
<b>C 16:0</b>	198.99 ± 1.84	166.41 ± 1.49	134.22 ± 1.19	NS	NS
<b>C 16:1</b>	11.95 ± 1.11	11.21 ± 1.94	10.50 ± 1.49	NS	NS
<b>C18:0</b>	175.79 ± 2.08	188.29 ± 5.99	201.21 ± 1.38	NS	NS
<b>C 18:1</b>	318.52 ± 1.63	304.93 ± 2.19	291.66 ± 0.74	NS	NS
<b>C 18:2</b>	103.03 ± 2.75	106.98 ± 1.37	111.16 ± 4.21	NS	NS
<b>C 18:3</b>	101.81 ± 1.48	92.88 ± 1.24	83.96 ± 1.69	NS	NS
<i>Cis -9, Trans-11</i>	31.23 ± 3.81 <sup>a</sup>	64.26 ± 1.73 <sup>b</sup>	97.32 ± 1.36 <sup>c</sup>	0.05	0.040
<i>Trans-10, Cis-12</i>	8.60 ± 1.32 <sup>a</sup>	16.21 ± 1.54 <sup>b</sup>	23.83 ± 2.33 <sup>c</sup>	0.001	NS
<b>CLA (otros)</b>	38.62 ± 1.92	35.58 ± 2.69	32.62 ± 1.25	NS	NS

<sup>a, b, c</sup> columnas con diferente literal indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

**AM0:** Tratamiento testigo, **AM3:** Tratamiento adicionado con 3% de aceite de maíz, **AM6:** Tratamiento adicionado con 6% de aceite de maíz

Los ácidos grasos presentes en plasma sanguíneo se presentan en el Cuadro 2. Las proporciones de C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3, no presentaron efecto significativo. La proporción de los isómeros de CLA (*Cis-9, Trans-11* y *Trans-10, Cis-12*) presentaron un contraste cuadrático ( $P \leq 0.014$ ) y lineal ( $P \leq 0.004$ ) significativos respectivamente conforme aumentó el nivel de aceite en la dieta

**Cuadro 2.** Proporción de ácidos grasos (mg/g) en plasma sanguíneo de ovejas Pelibuey suplementadas con aceite de maíz.

Ácidos Grasos	Tratamiento			Contraste	
	AM0	AM3	AM6	lineal	Cuadrático
<b>C 14:0</b>	2.20 ± 1.09	0.75 ± 0.73	2.18 ± 0.98	NS	NS
<b>C 16:0</b>	24.74 ± 2.80	17.50 ± 3.22	16.98 ± 2.57	NS	NS
<b>C 16:1</b>	6.21 ± 1.38	10.00 ± 2.75	6.77 ± 3.40	NS	NS
<b>C18:0</b>	20.97 ± 2.39	22.50 ± 1.77	24.87 ± 1.87	NS	NS
<b>C 18:1</b>	16.88 ± 4.51	18.96 ± 4.69	9.18 ± 1.93	NS	NS
<b>C 18:2</b>	8.92 ± 1.76	14.47 ± 1.35	11.56 ± 1.00	NS	NS
<b>C 18:3</b>	6.48 ± 0.72	4.82 ± 0.78	1.18 ± 0.47	NS	NS
<i>Cis -9, Trans-11</i>	1.14 ± 0.82 <sup>a</sup>	7.39 ± 1.33 <sup>b</sup>	6.36 ± 1.30 <sup>b</sup>	NS	0.014
<i>Trans-10, Cis-12</i>	2.29 ± 1.89 <sup>a</sup>	7.71 ± 1.89 <sup>b</sup>	15.21 ± 3.02 <sup>c</sup>	0.004	NS
<b>CLA (otros)</b>	2.20 ± 1.09	0.75 ± 0.73	2.18 ± 0.98	NS	NS

<sup>a, b, c</sup> columnas con diferente literal indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

**AM0:** Tratamiento testigo, **AM3:** Tratamiento adicionado con 3% de aceite de maíz, **AM6:** Tratamiento adicionado con 6% de aceite de maíz

Los ácidos grasos C14:0 y C16:1 en líquido folicular (Cuadro 3) presentaron una disminución lineal ( $P \leq 0.001$ , 0.025) y cuadrática ( $P \leq 0.081$ , 0.009) respectivamente, los C16:0 ( $P \leq 0.002$ ), C18:0 ( $P \leq 0.009$ ) y C18:3 ( $P \leq 0.009$ ) disminuyeron de manera lineal conforme aumentó el nivel de aceite en la dieta, el C18:1 mostró diferencias ( $P \leq 0.006$ ), siendo el ácido graso de mayor presencia en los tratamientos con un ~ 34 %, la presencia de los isómeros *Cis-9, Trans-11* ( 6 a 12 %) y *Trans-10, Cis12* ( 2 a 4 %) aumentaron de forma lineal conforme incrementó el nivel de aceite en la dieta.

El total de ovocitos obtenidos en el presente trabajo y clasificados en función de su aspecto morfológico se presentan en el Cuadro 4. Se observó un total de ovocitos para los tratamientos adicionados con el 3 % (27) y 6 % (28) de aceite de maíz en la dieta como para el testigo (20), a pesar de que los tratamientos adicionados con aceite de maíz presentan un ~ 55 % de ovocitos de excelente y buena calidad. Cuando se contrastan los ovocitos de excelente calidad, el tratamiento 6% (32.14 %) presenta diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento 3 % (22.22 %) y 0% (20 %).

**Cuadro 3.** Proporción de ácidos grasos (mg/g) en líquido folicular de ovejas Pelibuey suplementadas con aceite de maíz.

Ácidos Grasos	Tratamiento			Contraste	
	AM0	AM3	AM6	Lineal	Cuadrático
<b>C 14:0</b>	47.50 ± 2.42 <sup>a</sup>	25.78 ± 0.98 <sup>b</sup>	16.77 ± 1.35 <sup>c</sup>	0.001	0.081
<b>C 16:0</b>	295.40 ± 4.40 <sup>a</sup>	240.08 ± 3.27 <sup>b</sup>	163.52 ± 3.75 <sup>c</sup>	0.002	NS
<b>C 16:1</b>	13.34 ± 1.08 <sup>a</sup>	10.24 ± 0.98 <sup>b</sup>	3.78 ± 0.55 <sup>c</sup>	0.025	0.009
<b>C18:0</b>	70.35 ± 0.76 <sup>a</sup>	101.45 ± 1.02 <sup>b</sup>	260.00 ± 3.25 <sup>c</sup>	0.009	NS
<b>C 18:1</b>	311.22 ± 8.14 <sup>a</sup>	356.04 ± 6.32 <sup>b</sup>	360.19 ± 5.92 <sup>b</sup>	0.006	NS
<b>C 18:2</b>	133.32 ± 3.73	95.56 ± 2.75	137.83 ± 4.36	NS	NS
<b>C 18:3</b>	63.52 ± 0.87 <sup>a</sup>	19.23 ± 1.96 <sup>b</sup>	11.95 ± 1.61 <sup>c</sup>	0.009	NS
<i>Cis -9, Trans-11</i>	18.35 ± 1.33 <sup>a</sup>	57.65 ± 1.53 <sup>b</sup>	76.27 ± 1.14 <sup>c</sup>	0.002	NS
<i>Trans-10, Cis-12</i>	2.87 ± 1.73 <sup>a</sup>	20.04 ± 1.02 <sup>b</sup>	45.07 ± 1.16 <sup>c</sup>	0.003	NS
<b>CLA (otros)</b>	44.18 ± 4.06 <sup>a</sup>	73.94 ± 2.63 <sup>b</sup>	92.01 ± 2.11 <sup>c</sup>	0.05	NS

<sup>a, b, c</sup> columnas con diferente literal indican diferencia significativa (P<0.05)

**AM0:** Tratamiento testigo, **AM3:** Tratamiento adicionado con 3% de aceite de maíz, **AM6:** Tratamiento adicionado con 6% de aceite de maíz.

**Cuadro 4.** Calidad de ovocitos de ovejas Pelibuey suplementadas con tres niveles de aceite de maíz

Calidad Ovocitaria	Tratamientos		
	AM0	AM3	AM6
Excelente	4 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>
Buena	7	9	7
Regular	3	5	7
Mala	6	7	5

<sup>a, b, c</sup> columnas con diferente literal indican diferencia significativa (P<0.05)

**AM0:** Tratamiento testigo, **AM3:** Tratamiento adicionado con 3% de aceite de maíz, **AM6:** Tratamiento adicionado con 6% de aceite de maíz

## Discusión

### Líquido Ruminal *in vitro*

Las concentraciones de C18:0, C18:1 y C18:2 sugieren que la biohidrogenación por los microorganismos del rumen (Whitney *et al.*, 2000), a pesar de no encontrar diferencias en este trabajo para el C18:2 entre tratamientos, existe una tendencia lineal a aumentar las proporciones de este ácido graso conforme aumenta el contenido de aceite, lo cual podría aparentemente bloquear la conversión completa de 18:1 a 18:0 (Harfoot *et al.*, 1973). Los isómeros del CLA (*Cis-9, Trans-11* y *Trans-10, Cis-12*) aumentan de forma lineal conforme incremento el nivel de aceite en la dieta, concordando con Agazzi *et al.* (2004) quienes informan que el uso de aceites vegetales *in vitro* aumenta el nivel de CLA, disminuye las concentraciones de C18:0 y aumenta las concentraciones de C18:1, efectos que se hacen presentes en esta investigación. Por su parte, AbuGhazaleh y Holmes (2007), informan que la biohidrogenación del ácido linoleico es más eficiente en la producción de C18:1, lo cual podría explicar por qué se registran niveles más altos de CLA cuando se utiliza aceite de origen vegetal rico en ácido linoleico. Sin embargo, es importante analizar el contenido de ácidos grasos de los aceites a utilizar, ya que su contenido puede influir en el proceso de biohidrogenación y cambiar las rutas hacia la formación de otros intermediarios (Gunal *et al.*, 2013), lo que podría dificultar la determinación del verdadero origen de los intermediarios específicos de dicho proceso (Jenkins *et al.*, 2008).

### Plasma sanguíneo

Las concentraciones de C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 en plasma sanguíneo el día 28 del experimento no muestran diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, el cambio en las proporciones plasmáticas de ácidos grasos saturados a insaturados de las ovejas que consumieron aceite de maíz, reflejan una biohidrogenación incompleta de C18:1 y C18:2 en el rumen, incrementando la cantidad de estos ácidos grasos disponibles para la absorción en el intestino delgado (Whitney *et al.*, 2000) y pasar a sangre (Perehouskei *et al.*, 2009). Por su parte Fouladi-Nashta *et al.* (2009) alimentaron vacas productoras de leche con tres tipos de ácidos grasos (grasa protegidas, semillas de linaza y soya) encontrando diferencias para los ácidos grasos C18:0, C18:1, C18:2 a favor del tratamiento de semilla de linaza, indicando que la composición de los ácidos grasos del plasma refleja la composición de los ácidos grasos de la dieta y la alimentación a corto plazo de las vacas lecheras cambia el perfil de ácidos grasos en algunos tejidos y fluidos.

Los isómeros de CLA (*Cis-9, Trans-11 y Trans-10, Cis-12*) en este trabajo son mayores para el grupo que consumió 6% de aceite de maíz, datos que concuerdan a los reportados por Cook *et al.* (2011) en novillos de engorda alimentados con ácidos grasos comparados con los que fueron alimentados con granos. Fouladi-Nashta *et al.* (2009) mencionan un incremento de CLA en plasma de vacas alimentadas con semillas de linaza, por su parte Headley *et al.* (2012) informan que equinos alimentados con CLA aumentan su concentración circulante de isómeros de CLA en sangre y disminuye la circulación de C20:4.

### ***Líquido folicular y Ovocitos***

Entre los criterios que se utilizan para la selección de ovocitos se puede mencionar el estudio del líquido folicular, producto de la trasudación del plasma sanguíneo a través de la barrera folicular y de la actividad secretora de las células de la granulosa y la teca, generando un microambiente que influye sobre la morfología, desarrollo y maduración del ovocito (Shaaker *et al.*, 2011). Los ácidos grasos en líquido folicular pueden mediar e influenciar el nivel de expansión de células del cumulus y tiempo de reanudación de la maduración nuclear en los ovocitos, aspectos críticos para el desarrollo después de la fecundación (Marei *et al.*, 2010). La presencia de ácido palmítico (C16:0) en líquido folicular se asocia con malas morfologías del Complejo Ovocito Cumulos (COCs), mientras que el C18:1 favorece la morfología de los mismos (Aardema *et al.*, 2011), situación que queda de manifiesto en el presente estudio, ya que el C18:1 en líquido folicular de ovejas que consumieron 6% de aceite de maíz fue mayor (311.22 a 360.19 mg/g), siendo estos animales quienes presentaron un mayor número de ovocitos de excelente calidad (9), comparados con los que consumieron 3% (6) y 0% (4) de aceite. Por su parte, Aardema *et al.* (2013) informan que la presencia de ácido oleico es inofensivo en altas concentraciones y puede compensar los efectos lipotóxicos de los ácidos grasos saturados mejorando la competencia de los ovocitos. Sin embargo, una acumulación excesiva de ácidos grasos provoca hiperlipidemia reduciendo su desarrollo a estadios embrionarios avanzados (Leroy *et al.*, 2010) debido a que aumentan su vulnerabilidad al estrés oxidativo. Durante su crecimiento y maduración, el metabolismo energético se acelera e incrementa la presencia de especies reactivas al oxígeno (Valco *et al.*, 2007). En este sentido, la presencia de CLA (*Cis-9, Trans-11 y Trans-10, Cis-12*) en líquido folicular pudiera poseer una capacidad atrapante de radicales libres (Dinara *et al.*, 2000; Banni *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2001) inhibiendo su efecto y favoreciendo la calidad ovocitaria *in vivo*, ya

que se ha demostrado que el CLA posee dicha actividad cuando es comparado con antioxidantes sintéticos convencionales (Kelly, 2001). Estudios *in vitro* demuestran que la adición en los medios de cultivo del isómero *Trans-10*, *Cis-12* reduce la acumulación excesiva de lípidos, disminuyendo la hiperlipidemia que caracteriza a los embriones cultivados *in vitro*, mejorando su resistencia y tolerancia a la manipulación (Pereira *et al.*, 2008) aumentando la competencia de ovocitos bovinos para convertirse en embriones de mejor calidad (Lapa *et al.*, 2011)

## Conclusión

Los resultados del presente estudio indican que la adición de aceite de maíz en la dieta de ovejas de pelo, incrementa la producción de isómeros de CLA (*Cis-9*, *Trans-11* y *Trans-10*, *Cis-12*) en líquido ruminal y folicular, mejorando la calidad de los ovocitos recolectados.

## Referencias

Aardema H, Vos L.A.M., Lolicato F., Roelen A.J.B., Knijn M.H., Vaandrager B.A., Helms B., Gadella B.M. (2011) Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine Oocyte developmental competence. *Biol Rep.* 85: 62-69.

Aardema, H., Lolicato, F., Van de Lest, C.H.A., Brouwera, J.F., Vaandrager, A.B., van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., Vos, L.A.M, Helms, B., Gadella, B.M. (2013). Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Rep* 88(6): 1-15.

AbuGhazaleh, A.A. and Holmes, L.D. (2007). Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows *J. Dairy Sci.* 90(6): 2897–2904.

AFRC. (1993). Technical Committee on Response to Nutrients. Energy and Protein Requirements of Ruminants. CAB International, Wallingford, UK.

Agazzi, A., Bayourthe, C., Nicot, M.C., Troegeler-Meynadier, A., Moncoulon, R., Enjalbert, F. (2004). In situ ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat straw. *Anim. Feed Sci Technol.* 117:165-175.

Banni, S., Angioni, E., Contini, M., Carta, G., Casu, V., Lengo, G., Melis, P., Deiana, M., Dessi, A., Corongiu, F. (1998). Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J. Am Oil Chem Soc.* 75: 261-267.

Belury, M.A., (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr.* 22:505-531.

Castañeda, G.E., Benefield, B.C., Veth, M.J., Santos, N.R., Gilberth, R.O., Butler, W.R., Bauman, D.E., (2007). Evaluation of mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. *J Dairy Sci.* 90: 4253-4264.

Cook, R.F., Bohnert, D.W., Moriel, P., Hess, B.W., Mills, R.R. (2011). Effects of polyunsaturated fatty acid supplementation on ruminal in situ forage degradability, performance and physiological responses of feeder cattle. *J Anim Sci.* 89: 3677-3689.

Dinara, S., Sengoku, K., Tamate, K., Harikana, M., Ishikawa, M. (2000). Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod.* 16: 1976- 1981.

Fouladi-Nashta, A.A., Wonnacott, K.E., Gutierrez, G.C., Gong, J.G., Sinclair, K.D., Garnsworthy, P.C., Webb, R. (2009). Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction.* 138: 771-781.

Funston, R.N. (2004). Fat supplementation and reproduction in beef females. *J Anim Sci.* 82: 154-161.

Gómez, N.A., López, A.P., Ortiza, L.F., Ruiza, Z.T., Olivera, M., Tarazon, A. (2013). Efecto del ácido linoleico conjugado sobre la proporción de sexos y calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Arch Med Vet.* 45: 17-24.

Gunal, M., Ishlak, M., Abuchazaleh, A.A. (2013). Evaluating the effects of six essential oils on fermentation and biohydrogenation in vitro rumen batch cultures. *Czech J Anim Sci.* 558 (6): 243-252.

Harfoot, C.G., Noble, R.C., Moore, J.H. (1973). Food particles as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem J.* 132: 829-832.

Headley, S., Coverdale, J.A., Jenkins, T.C., Klein, C.M., Sharp, J.L., Vernon, K.L. (2012). Dietary supplementation of conjugated linoleic acid in horses increases plasma conjugated linoleic acid and decreases plasma arachidonic acid but does not alter body fat. *J Anim Sci.* 90: 4876 - 4882.

Herman-Lara, E., Santos-Blanco, V.M., Vivar-Vera, M.A., García, H.S., Ochoa-Martínez, L.A., Martínez-Sánchez, C.E. (2012). Conjugated linoleic acid content in selected Mexican beef and dairy products. *J Food.* 10 (1): 71-77.

Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E. (2008). BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 86(2): 399-412.

Kelly, G.S. (2001). Conjugated linoleic acid. *Alter Med Rev.* 6: 367-382.

Kevin, J.H., Perfiedl, J.W., Bauman, D.E. (2009) Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is preregulated in adipose tissue during CLA induced milk fat depression in dairy cows. *J Nutr.* 139: 849-854.

Lapa, M., Marques, C.C., Alves, S.P., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Carvalhais, I., Silva, M., Horta, A.E.M., Bessa, R.J.B., Pereira, R.M. (2011). Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reprod Domest Anim.* 46: 904-910.

Leroy, M.R., Hoeck, V.V., Clemente, M., Rizos, D., Gutierrez, A.A., Soom, V.A., Uytterhoeven, M., Bols, P.E.J. (2010). The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Hum Reprod.* 25(3): 768-778.

Lin, H., Boylston, T.D., Chang, M.J., Luedecke, L.O., Shultz, T.D. (1995). Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J Dairy Sci.* 78: 2358-2365.

Ma, D.W., Wierzbicki, L.A.A., Field, C.J., Clandinin, T.M. (1999). Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *J Agri Food Chem.* 47: 1956-1960.

Medeiros, S.R., Oliveira, D.E., Aroeira, L.J.M., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Lanna, D.P.E. (2010). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid to grazing cows in early lactation. *J Dairy Sci.* 93(3): 1126-1137.

Marei, W.F., Whates, C.D., Fouladi-Nashta, A. (2010). Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction.* 139: 979-988.

Menke, K. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev.* 28: 7-55.

Patricio, P., Tucker, M.J., Guelman V. (2003). Atlas de reproducción asistida. Editorial McGraw Hill, México.

Perehouskei, A.K., Nunes, P.I., Bim, C.F.L., Paulo, R.L., Martin, P.R., Pizzi, R.P. (2009). Fatty acid composition in blood plasma and follicular liquid in cows supplemented with linseed or canola grains. *Asian-Aust. J Anim Sci.* 22(9): 1248-1255.

Pereira, R.M., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Portugal, P.V., Bessa, R.J.B., Chagas, E., Silva, J., Pereira, M.S., Marques, C.C. (2007). Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (t10, c12 CLA). *Anim Reprod Sci.* 98: 293-301.

Pereira, R.M., Carvalhais, I., Pimenta, J., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Santos, I.C., Marques, M.R., Reis, A., Silva, P.M., Marques, C.C. (2008). Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Anim Reprod. Sci.* 106: 322-332.



Roche, H.M., Noone, E., Nugent, A., Gibney, M.J. (2001). Conjugated acid: a novel therapeutic nutrient. *Nutr Res Rev.* 14:173-187.

Russel, A.J.F., Doney, M.J., Gunn, R.G. (1969). Subjective assessment of fat in live sheep. *J Agr Sci.* 72: 451-454.

Schlegel, G., Ringseis, R., Shibani, M., Most, E., Schuster, M., Schwarz, F. J., Eder, K. (2012). Influence of a rumen-protected conjugated linoleic acid mixture on carcass traits and meat quality in young simmental heifers. *J Anim Sci.* 90: 1532 - 1540.

Shaaker, M., Rahimipour, A., Nouri, M., Khanaki, K., Darabi, M., Farzadi, L., Shahnazi, V., Mehdizaeh, A. (2012). Fatty acid composition of human follicular fluid phospholipids and fertilization rate in assisted reproductive techniques. *Iran Biomed J.* 16(3): 162-168.

SPSS 15.0 para Windows. (2006). SPSS inc.

Statistic. (1996). program manual. Analytical software. Tallahassee. FL.

Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., Mcallan, A., France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech.* 48:185-197

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.

Veth, J.M., Bauman, D.E., Koch, W., Mann, G.E., Pfeiffer, A.M., Butler, W.R. (2009). Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci.* 92: 2662-2669.

Weiss, M.F., Martz, F.A., Lorenzen, C.L. (2004). Conjugated Linoleic Acid: Historical Context and Implications. *Prof Anim Sci.* 20: 118-126.

Whitney, M.B., Hess, B.W., Burgwald-Balstad, L.A., Sayer, J.L., Tsopito, C.M., Talbott, C.T., Hallfor, D.M. (2000). Effects of supplemental soybean oil level on in vitro digestion and performance of prepubertal beef heifers. *J Anim Sci.* 78: 504-514.

Yu, L. (2001). Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acid. *J Agric Food Chem.* 49 3452-3456