

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO EN LA ACTIVIDAD OVÁRICA Y LOS NIVELES SÉRICOS DE INSULINA EN CABRAS

C.A. Meza Herrera¹, L.C. Hernández Valenzuela¹, R. Bañuelos Valenzuela²,
C.F. Aréchiga Flores², R.M. Rincón Delgado², J.M. Flores Nájera³

¹ Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas

² Universidad Autónoma de Zacatecas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

RESUMEN. Se evaluó el efecto de suplementación de beta-caroteno sobre la actividad ovárica considerando folículos totales (FT) y cuerpos lúteos totales (CLT), así como la actividad ovárica total (AOT, FT+CLT) y niveles séricos de insulina en cabras. El estudio se desarrolló en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH, localizada entre los 25° LN y 103° LO, a 1117 msnm., en los meses de febrero a mayo. Las cabras (n=20) fueron distribuidas en dos grupos experimentales con peso vivo y condición corporal homogéneos. A cada grupo se le asignó en forma aleatoria uno de dos tratamientos experimentales, 1) Grupo control (CONT, n = 10; PV = 44.75 ± 3.04) y 2) BETA (BETA, n = 10; PV 44.15 ± 2.93) el cual consideró una suplementación de 50 mg. de b-caroteno cabra⁻¹ día⁻¹ durante todo el experimento. Las cabras recibieron una dieta que cubría el 100% de sus requerimientos nutricionales a base de alfalfa heno (14% PC; 1.14 Mcal Kg⁻¹ ENm) con acceso libre a agua, sales minerales y sombra. Las cabras fueron estrualmente sincronizadas mediante esponjas intravaginales impregnadas de progesterona (P₄) mismas que fueron retiradas 9 días después, además con una aplicación de cloprostenol. El día 19 después del estro se colectaron muestras sanguíneas durante 6 horas cada 60 minutos en ambos grupos experimentales para ser evaluadas por contenido de insulina. Posteriormente, hacia la fase lútea tardía se realizó el análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica total, considerando FT, CLT y AOT. El grupo BETA no difirió en el número de FT (P=0.38), CLT (P=0.33), y la AOT (P=1.0) con respecto al grupo CONT. Lo mismo ocurrió con respecto al nivel sérico de insulina (P=0.06). La suplementación con b-caroteno no mostró efectos positivos sobre la actividad ovárica total al no mostrar diferencias entre tratamientos para las variables estudiadas. Debido a que tanto el peso vivo como la condición corporal no difirieron entre tratamientos, futuros estudios deberán evaluar un posible efecto de b-caroteno sobre otras hormonas como progesterona o estradiol. Esta última podría estar influyendo la falta de respuesta de LH a b-caroteno debido a que bajo fotoperiodos crecientes, tanto la amplitud como la pulsatilidad de LH es limitada por E₂, el cual actúa a nivel pituitaria para limitar su respuesta a GnRH.

Palabras clave: b-caroteno, LH, cabras, actividad ovárica

SUMMARY. The effect of the beta-carotene supplementation upon the total ovarian activity, considering total follicles number (FT), total corpus luteum number (CLT), and total ovarian activity (AOT, FT+CLT), as well as serum levels of insulin in goats was evaluated. The study was carried-out in the URUZA-UACH Southern Goat Research Unit, located between the 25° LN and 103° LO, to 1117 msnm. during the months of February to May. Goats (n=20) were randomly distributed in two experimental groups with live weight and homogeneous corporal condition. Each group was randomly assigned to one of two experimental treatments, 1) CONTROL (CONT, n=10; PV= 44.75 ± 3.04) and 2) BETA (BETA, n=10; PV=44.15 ± 2.93) which considered a supplementation of 50 mg of b-carotene goat⁻¹ during the whole experimental period. Goats received a diet that meets 100% of their nutritional requirements with a diet based on alfalfa hay (14% PC; 1.14 Mcal Kg⁻¹ ENm), with free access to water, mineral salts and shade. Goats were estrually synchronized by means of sponges impregnated with progesterone (P₄) which were removed 9 days later, with a cloprostenol application. The day 19 after the estrus blood samples were collected during 6 hours every 60 minutes in both experimental groups to be evaluate their content of serum insulin. Later on, toward the late luteal phase, an ultrasonographic analysis of the ovarian activity was carried out, considering FT, CLT and AOT. The group BETA did not differ for FT (P=0.38), or CLT (P=0.33) with regard to the control group. The same was true for the total ovarian activity (AOT, P=1.0) as well as for the serum insulin levels (P=0.06). The supplementation with b-carotene did not show positive effects upon total ovarian activity because it did not show any difference between treatments. Because both body weight and body condition depicted no differences between treatments, future studies should evaluate a possible effect of b-carotene on other hormones like progesterone or estradiol. In fact, estradiol may be influencing the lack of ovarian response to b-carotene because under increasing photoperiods, the amplitude and pulsatility of LH could be limited by E₂, which operates at pituitary level to limit its response to GnRH, reducing in this way the ovarian activity.

Key words: b-carotene, LH, goats, ovarian activity

INTRODUCCIÓN

El suplementar con β -caroteno aumenta la fertilidad en el ganado estresado por el calor (Arechiga *et al.*, 1998) y el alimentar con caroteno a las vacas lecheras altas productoras casi duplica su tasa de concepción en la segunda o tercera lactación en los nacimientos de septiembre a diciembre, pero no altera las tasas de concepción en las lactaciones posteriores o vacas jóvenes que paren durante enero a abril (Folman *et al.*, 1987). Lo anterior debido a que al caroteno se le atribuyen una variedad de acciones biológicas no directamente relacionadas con su función como precursor de retinol, sino como eliminador de radicales libres, especialmente los del oxígeno, y de esta forma, actúa como un potente antioxidante (Folman *et al.*, 1987).

Además, se ha observado que el β -caroteno influye sobre la síntesis de progesterona en células cultivadas del cuerpo lúteo, el tejido con la mayor concentración de β -caroteno en donde su participación en la división del cuerpo lúteo indica una conversión del β -caroteno a vitamina A en el tejido blanco, por lo que se ha especulado que sea el responsable de las altas concentraciones de vitamina A en folículos no atrésicos, comparados con los atrésicos. La actividad divisoria del cuerpo lúteo del β -caroteno está significativamente correlacionada con todos los parámetros que indican calidad folicular, tales como la concentración intrafolicular de estradiol-17 β , el estradiol, la relación estradiol: progesterona y retinol, y no tanto como una función del tamaño de los folículos (Schweigert *et al.*, 1988).

Tanto *in vivo* como *in vitro*, la síntesis de varias hormonas esteroidales en los testículos y los ovarios esta disminuida en animales deficientes en vitamina A, por lo que basados estas investigaciones, la escasez de β -caroteno puede ocasionar consecuentemente una menor formación de vitamina A en las estructuras foliculares, ocasionando un daño en la síntesis de proteínas o esteroides (Schweigert *et al.*, 1988).

Algunos estudios han demostrado que la reducción en el estatus nutricional de los animales puede deprimir la función endocrina. Esto puede retardar la aparición de la pubertad en animales jóvenes y bajar la eficiencia reproductiva en adultos (Sisk y Bronson, 1986; Smith, 1988). De hecho, los cambios en el estatus nutritivo pueden alterar el perfil de algunas hormonas metabólicas y afectar, tanto la síntesis como la liberación de hormonas gonadotrópicas (Schillo *et al.*, 1982; Smith, 1988; Teleni y Rowe, 1986), cambios que pueden promover diferentes respuestas en la sensibilidad del ovario a las influencias endocrinas (LH,

FSH), autocrinas y(o) paracrinas de ciertos factores de crecimiento que pueden influenciar el desarrollo folicular, la tasa de ovulación y la función lútea, por lo que el uso de agentes protectores celulares, como el β -caroteno, puede aumentar la sensibilidad del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, a un ambiente endocrino específico y por lo tanto, aumentar la eficiencia reproductiva.

Al medir el efecto del β -caroteno en cabras en la región de la Comarca Lagunera Rodríguez-Martínez *et al.* (2002) reportaron que las cabras suplementadas con β -caroteno presentaron número mayor de folículos totales aunque el número de cuerpos lúteos no fue diferente, encontrando que la actividad ovárica total fue positivamente afectada con la suplementación de β -caroteno afectando positivamente las capacidad reproductiva de las cabras. Los efectos sobre la fertilidad de la suplementación alimenticia con β -caroteno en bovino lechero es tema controversial, ya que aunque algunos investigadores han reportado respuestas benéficas, otros han reportado efectos adversos (Arechiga *et al.*, 1998; Schweigert *et al.*, 2001).

En el ganado caprino no se tienen suficientes estudios acerca del efecto del suplemento de β -caroteno sobre la eficiencia reproductiva de las cabras en la Comarca Lagunera, a pesar de ser una región con una alta población caprina y con condiciones ambientales que afectan la capacidad productiva del ganado, como son una temporada invernal de alimentos con bajo contenido de caroteno y un estrés calórico durante la mayor parte del año.

Con el fin de evaluar el efecto la suplementación que este antioxidante tiene sobre la reproducción y producción de esta especie, se plantó el experimento. La hipótesis de trabajo del estudio consideró que la suplementación con Betacaroteno en cabras adultas, bajo condiciones de fotoperíodo creciente, promueve la expresión de mecanismos fisiológicos extra e intra ováricos que genera incremento en la tasa ovulatoria total, generando en forma paralela mayor eficiencia reproductiva de la hembra, estando relacionado positivamente a incrementos en los niveles de insulina en suero

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área experimental y condiciones ambientales. El estudio se realizó en la Unidad Experimental Caprina de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, de la Universidad Autónoma Chapingo. Esta se ubica en el municipio de Tlahualilo, Durango, entre las coordenadas geográficas 25° 53' LN y 103° 36' LO, con una altitud de 1,117 msnm. Las

características climáticas del área incluyen clima cálido-seco BW, con una marcada oscilación térmica y con precipitación y temperatura media anuales de 217.1 mm y 22.3°, respectivamente. El mes más cálido es junio con temperaturas superiores a los 40°C y el mes más frío es enero con temperaturas mínimas de 0 °C.

Formación de grupos experimentales. El estudio consideró 20 cabras $\frac{3}{4}$ Saanen-Alpina, con una edad y peso promedio de cuatro años y 44.45 kg, respectivamente. Las cabras recibieron una dieta a base de heno de alfalfa (PC 14% y 1.14 Mcal ENm) y maíz rolo (PC 11.2% y 2.38 Mcal ENm) ofreciendo el 100% de sus requerimientos nutricionales ajustados al peso vivo (NRC, 1988). Se ofreció agua limpia y fresca, sales minerales y sombra a libre acceso durante todo el periodo experimental el cual consideró 133 días. Los grupos experimentales fueron alimentados dos veces al día: por la mañana (0800) heno de alfalfa y por la tarde (1800) heno de alfalfa y maíz rolo, bajo condiciones naturales de luz.

Diseño de tratamientos. Las cabras fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos con peso promedio homogéneo y fueron asignadas a uno de dos tratamientos: 1) BETA (n=10, PV=44.45±1 Kgs.) con suplementación de Betacaroteno (C₄OH₅₆, Syntex S.A. de C.V.), en una dosis diaria, vía oral, de 50 g animal⁻¹, y 2) CONTROL, sin suplementación de Betacaroteno (n=10, PV= 44.45±1 Kgs.). Todas las cabras continuaron con dieta a base de heno de alfalfa y maíz rolo durante todo el periodo experimental, el cual consideró 133 días.

Sincronización del estro. Las cabras fueron estrualmente sincronizadas mediante el uso de esponjas intravaginales impregnadas de Progesterona, que haría las veces de un cuerpo luteo (Intervet International B.V. Boxmeer-Holland). Nueve días posteriores a su colocación, las esponjas fueron retiradas y se aplicó Cloprostenol (Prosolvin C^{MR} (Intervet International B.V. Boxmeer-Holland), el cual es un análogo sintético de Prostaglandina F_{2a} a razón de 1 mL animal⁻¹ (0.075 mg mL⁻¹ cabra⁻¹), con el fin de provocar la regresión de cualquier cuerpo lúteo que se encontrara presente en cualquier cabra. Lo anterior promovió una disminución en las concentraciones de P4, generando el inicio de una fase folicular con el consiguiente aumento en la secreción de E2 y LH desencadenando la cascada hormonal, y la consecuente ovulación 48 h después.

Muestreo sanguíneo intermitente y cuantificación de insulina. Una vez ocurrida la primera ovulación, después de transcurrida la fase lútea y hacia la parte media de la fase folicular, se seleccionaron en forma aleatoria cinco cabras dentro del tratamiento para

realizar un muestreo sanguíneo intermitente. Las muestras colectadas fueron tomadas mediante la venopunción y utilizando tubos Vacutainer y agujas estériles por un periodo de 6 h a intervalos de 60 min. Una vez en el laboratorio, las muestras se dejaron reposar por 30 min. a temperatura ambiente hasta observarse la formación del coagulo, posteriormente fueron centrifugadas (1500 x g) durante 15 min. Cada muestra de suero fue colectada y almacenada en micro tubos de polipropileno de 2 mL (MCT150C, Axygen^{MR} Scientific, Inc., CA, USA) a una temperatura de -20°C. En total se colectaron 24 muestras por cabra, 120 por tratamiento, con un total de 240 muestras de suero originales, las cuales fueron evaluados mediante RIA por su contenido de Insulina de acuerdo a los procedimientos señalados por Hoefler y Hallford, (1987), observando un Coeficiente de Variación Intra ensayo de 9.8 % y un límite de detección de 0.2 ng mL⁻¹. Todos los análisis hormonales fueron realizados en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Ciencia Animal, de la Universidad Estatal de Nuevo Mexico, en Las Cruces, NM, USA.

Análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica. El día 17 posterior a la segunda ovulación la actividad ovárica total fue determinada mediante un estudio de ultrasonografía transrectal. Previo al análisis ultrasonográfico, las cabras fueron colocadas en una mesa de recumbencia dorsal, sujetadas a ésta por las extremidades anteriores y posteriores. Se utilizó un equipo Toshiba Medical Systems, Ltd, Crawley, UK con un transductor lineal de 7.5 Mhz para uso veterinario. Se aplicó un gel obstétrico (Lebrel, Arnold Veterinary Products. Ltd USA) al transductor el cual se colocó dentro de un preservativo de látex estéril aplicándole nuevamente gel por fuera como lubricante. Las evaluaciones ultrasonográficas fueron realizadas por un experto en imagen, quien desconocía cualquier información previa de la cabra o del tratamiento al que fue expuesta (Dickie *et al.*, 1999). El número y diámetro de las estructuras foliculares, mayores y menores a 5 mm, así como de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios fueron registrados como fotografiados.

Análisis estadísticos. Los pesos corporales, la condición corporal, así como la actividad ovárica considerando el número de folículos y cuerpos lúteos totales, fueron evaluados mediante análisis de varianza dentro de un diseño completamente al azar con dos tratamientos y 10-12 repeticiones por tratamiento (Snedecor y Cochran, 1967). Las concentraciones séricas de insulina fueron evaluadas mediante un ANOVA con diseño completamente al azar con un arreglo de parcelas divididas para muestras repetidas en el tiempo. Mientras que los efectos de tratamiento fueron incluidos en la parcela mayor, el tiempo de

muestreo y la interacción tratamiento por tiempo fueron incluidos en la parcela menor usando el término cabra dentro de tratamiento para calcular el error. La separación de medias consideró el procedimiento PDIFF para probar sus diferencias mediante el PROC LSMEANS. Todos los análisis utilizaron los procedimientos del paquete estadístico SAS (SAS, 1991). Los valores reportados son las medias de mínimos cuadrados \pm el error estándar de las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso vivo y condición corporal al momento de la sincronización y al ultrasonido. En el Cuadro 1, se concentran las medias de mínimos cuadrados para peso vivo al momento de la sincronización (PV Sincro), condición corporal a la sincronización (CC Sincro), peso vivo al ultrasonido (PV US) y condición corporal al ultrasonido (CC US) de las cabras pertenecientes al grupo suplementado con β -caroteno (Beta) y al grupo control (Control). De acuerdo al resultado del análisis estadístico éstas variables no difirieron ($P > 0.09$) entre tratamientos, manteniéndose lo más homogéneamente posible tanto el peso vivo como la condición corporal entre los grupos experimentales.

Folículos totales, cuerpos lúteos totales, actividad ovárica total y niveles séricos de insulina. En el Cuadro 2, se incluyen los resultados para folículos totales (FT), cuerpos lúteos totales (CLT), la actividad ovárica total (AOTFT) y los niveles séricos de insulina

para ambos tratamientos. En lo que respecta a la variable folículos totales, no existieron diferencias ($P = 0.38$) entre grupos. Esta misma situación fue observada tanto para la actividad ovárica total ($P = 1.0$), cuerpos lúteos totales ($P = 0.33$) así como en los niveles séricos de insulina (INS), al no existir diferencias ($P = 0.09$) entre grupos experimentales.

Al respecto, Velásquez-Méndez (2004) demostró que en cabras suplementadas vía oral con B-caroteno mostraron mayor actividad ovárica total y que dicho efecto no podía ser atribuido a diferencias en PV o CC ya que dichas variables mostraron un comportamiento homogéneo entre grupos experimentales.

Sin embargo, en el presente estudio, la suplementación de B-caroteno fue realizada bajo fotoperíodos crecientes, por lo que, probablemente se ejerció una estricta sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisiario a la retroacción negativa de estradiol, y en consecuencia, se observó una baja en la pulsatilidad de GnRH y por consiguiente en la liberación de hormonas gonadotropinas, generando así una reducción en la actividad ovárica. Vargas-Beltrán (2004) en evaluación de B-caroteno como promotor de la activación de mecanismos fisiológicos que aumentan la actividad ovárica total en respuesta a un incremento en LH asociado positivamente a insulina, no encontró diferencias entre grupos experimentales, bajo condiciones de fotoperíodo decreciente entre Octubre y Noviembre en la Comarca Lagunera.

Cuadro 5.1. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV Sincro, Kg), y condición corporal (CC Sincro, unidades) al momento de la sincronización, peso vivo (PV us, Kg), y condición corporal (CC us, unidades) al momento del ultrasonido en cabras adultas (n=20) suplementadas durante Marzo y Abril con β caroteno (Beta) o Control bajo fotoperíodo natural creciente en la Comarca Lagunera (25° LN)

	TRATAMIENTO		E.E ²	NSO ¹
	Beta	Control		
PV Inicial	44.15	44.75	0.95	0.6592
CC Inicial	3.40	3.42	0.04	0.6601
PV Sincro	44.70	44.90	0.37	0.6364
CC Sincro	3.30	3.35	0.05	0.4486
PV us	48.70	48.40	1.27	0.8695
CC us	3.30	3.32	0.063	0.7847

¹Nivel de significancia observado

²EE, error estándar de mínimos cuadrados más conservador

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para folículos totales (FT, > 5 mm), actividad ovárica total (AOTFA) y niveles séricos de insulina (INS, ng mL⁻¹) durante la fase folicular media en cabras adultas (n=20) suplementadas durante febrero a mayo con Betacaroteno (Beta) o Control (Control) en la Comarca Lagunera (25° LN)

	TRATAMIENTO			
	Beta	Control	E.E	NSO
FT	2.00	2.30	0.2368	0.38
CLT	1.80	1.50	0.2121	0.33
AOTFT	3.80	3.80	0.2494	1.00
INS	0.461	0.614	0.066	0.09

Cox et al. (1987) encontró que la administración de insulina durante el desarrollo folicular preovulatorio incrementa la tasa ovulatoria y disminuye la atresia folicular en vaquillas ciclando además de incrementar la tasa de parición y el tamaño de carnada, sin embargo, en el presente estudio la administración oral de B-caroteno no promovió una mayor expresión de niveles séricos de insulina o en la actividad ovárica. Al respecto se ha reportado que la insulina actúa a nivel hipotalámico incrementando el nivel de glucosa, y en la hipófisis aumentando los receptores tanto de IGF1 como de insulina. Bajo dicho escenario, los IGF aumentan la respuesta a GnRH con lo que amplifica la secreción de gonadotropinas, mientras que los niveles ováricos de insulina y sus receptores aumentan la esteroidogénesis incrementando los efectos de IGF-1, los que actúan sinérgicamente con LH y FSH promoviendo la multiplicación de las células de la granulosa y la producción de esteroides (Poretsky *et al.*, 1999).

Weng *et al.*, (2000) encontraron que caninos absorben el B-caroteno de la dieta y lo transfieren hacia la sangre, cuerpo lúteo y el endometrio uterino, donde este juega un papel importante optimizando la integridad funcional de estos tejidos. Además la ingesta de B-caroteno incrementa la concentración plasmática de progesterona, acelerando el tiempo a la ovulación. Weng *et al.* (1997), demostraron que el incremento plasmático de B-caroteno es dependiente del incremento en la dosis oral dada. Las más altas concentraciones plasmáticas de B-caroteno en una dosis oral ocurren aproximadamente 6 h después de la administración manteniéndose en este por 3 ó 4 h.

El B-caroteno es un potente antioxidante especialmente en tejidos donde es parcialmente baja la presión de oxígeno (Burton e Ingold, 1984). Como un antioxidante

el B-caroteno protege las células de la demanda algunos tipos de oxígeno radiactivo, lo cual es producido durante el metabolismo normal de la célula o cuando es inducida a estrés ambiental o químico. Durante la preñez, el útero esta expuesto a cambios dramáticos para asegurar la implantación y sobrevivencia dando un rápido desarrollo al *conceptus*. Debido a esto la entrada de B-caroteno en el endometrio uterino puede proteger el ambiente altamente activo del útero contra el estrés oxidativo, asegurando un ambiente mas optimo para el desarrollo del embrión.

Después de la ovulación las células de la teca y la granulosa del folículo ovárico, tienden a proliferar y diferenciarse comenzando a formar un cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo produce progesterona que es crítico para el mantenimiento de la preñez. Consecuentemente el B-caroteno puede servir para la protección del cuerpo lúteo ya que su demanda estructural y funcional tiene que soportar una optima actividad esteroidogénica (Weng *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

La suplementación diaria de 50 mg de b-caroteno cabra¹ no generó incrementos en la actividad ovarica total, no existiendo diferencias entre los grupos experimentales para folículos totales, y cuerpos lúteos totales.

La actividad ovárica total (FT+CLT), como los niveles séricos de insulina, no difirieron entre tratamientos. Así como el peso vivo como la condición corporal no difirieron entre tratamientos.

Futuros estudios deberán evaluar un posible efecto de b-caroteno sobre otras hormonas como progesterona o estradiol. Esta última podría estar influyendo sobre una posible falta de respuesta del eje hipotalámico-

hipofisiario-gonadal a la suplementación de b-caroteno debido a que bajo fotoperiodos crecientes, tanto la amplitud como la pulsatilidad de LH es limitada por E₂ el cual actúa a nivel pituitaria para limitar su respuesta a GnRH.

LITERATURA CITADA

- Arechiga, C.F., C.R. Staples, L.R. McDowell and P.J. Hansen. 1998. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J Dairy Sci* 81: 390-402.
- Burton, G.W. and K.U. Ingold. 1984. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:569-573.
- Cox, N.M., M.J. Stuart, T.G. Althen, W.A. Benette and H.W. Miller. 1987. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J An Sci.* 64:507-516
- Dickie, A.M., C. Paterson, L.M. Anderson and J.S. Boyd. 1999. Determination of corpora lutea numbers in Boroala-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology* 51: 1209-1224.
- Folman, Y., I. Ascarelli, D. Kraus and H. Barash. 1987. Adverse effect of beta-carotene in diet on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 70: 357-366.
- Hoefler, W.C. and D.M. Hallford. 1987. Influence of suckling status and type of birth on serum hormone profiles and return to estrus in early postpartum spring lambing ewes. *Theriogenology.* 27: 887-893.
- NRC. 1988. Nutrient Requirements of Goats. National Academy Press, Washington, DC.
- Poretsky, L., N.N. Catalondo, Z. Rocenaks and L.C. Giudice. 1999. The insulin related ovarian regulatory system health and diseases. *Endocrinol:* 20(4):535-582 .
- Rodríguez-Martínez R., G. Arellano-Rodríguez, C.A. Meza-Herrera y G. Castillo. 2002. Effect of β-carotene food supplementation upon ovary activity and hormonal profile in goats from Region Lagunera. *Revista UAAAN-UL.* ISBN 968-844-030-2. p. 11-17
- SAS, 1991. SAS/STAT user's guide. SAS Institute, NC, USA.
- Schillo, K.K., D.J. Dierschke and E.R. Hauser. 1982. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: Increased threshold to negative feedback action of estradiol. *J Anim Sci* 54: 3-25336.
- Schweigert, F.J., M. Weirich, W.A. Rambeck and H. Zucker. 1988. Carotene cleavage activity in bovine ovarian follicles. *Theriogenology;* 30:923-930.
- Schweigert, F.J. and H. Zucker. 2001. Concentration of vitamin A, B-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J Reprod Fertil.* 82:575-579.
- Sisk, C.L. and F.H. Bronson. 1986. Effects of food restriction and restoration on gonadotropin and growth hormone secretion in immature male rats. *Biol Reprod* 35: 554-561.
- Smith, J.F. 1988. Influence of nutrition on ovulation rate in the ewe. *Aust J Biol Sci* 41: 27-36.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. *Statisticals Methods.* 6a. Ed. The Iowa State University. Press, Ames
- Teleni, E. and J. B. Rowe 1986. Ovulation rate of ewes: role of energy and protein. *Journal Agriculture, Western Australia.* 27:36-38.
- Vargas-Beltran, F. 2004. Suplementación de betacaroteno y su efecto sobre la actividad ovarica y las concentraciones sericas de Hormona Leutinizante e Insulina en cabras. Tesis. URUZA-UACH, Bermejillo, Durango. México.
- Velásquez-Méndez, G. 2004. Efecto de la suplementacion de Betacaroteno sobre la actividad ovarica en cabras. Tesis. URUZA- UACH, Bermejillo, Durango. México.
- Weng, B.C., B.P. Chew, J.S. Park, T.S. Wong, R.L. Combs, M.G. Hayek and G.A. Reinhart. 1997. β-Carotene uptake by blood plasma and leukocytes in dogs. *FASEB J.* 10:A180 (Abstr.).
- Weng, B.C., B.P. Chew, T.S., Wong, J.S., Park, H.W. Kim, and A.J. Lepine. 2000. β-Carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *J. Anim. Sci.* 78:1284-1290