

EFEECTO DE LA SUPLEMENTACION DE BETACAROTENO SOBRE LA ACTIVIDAD OVARICA EN CABRAS

EFFECT OF BETACAROTENE SUPPLEMENTATION UPON OVARIAN ACTIVITY IN GOATS

C. A. Meza Herrera^{1,3}, G. Velásquez Méndez¹, J. G. Chávez Perches²,
H. Salinas González y J. Urrutia-Morales.³

¹ Unidad Regional Univesitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. A.P. 8, Bermejillo, Durango. México. 35230.

² Gabinete de Radiodiagnóstico y Ultrasonografía. Torreón, Coahuila.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

RESUMEN. El objetivo fue evaluar el efecto de la suplementación de betacaroteno sobre la actividad ovárica total (AOT), considerando folículos totales (FT) y cuerpos lúteos totales (CLT) cabras. La investigación se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH localizada entre 25° LN y 103° LO a 1117 msnm. Las cabras (n=22) fueron aleatoriamente 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 Betacaroteno, el cual consideró una suplementación de 50 g de betacaroteno cabra⁻¹ d⁻¹, (BETA, n=10; PV=45.97±5.14 kg) y 2) Grupo Control, (CONT, n=12; PV=46.20±5.87 kg). El periodo experimental consideró 34 días antes y 17 días después de la ovulación bajo fotoperíodos decrecientes (Octubre-Diciembre del 2002). Las cabras recibieron una dieta que cubría el 100% de sus requerimientos nutricionales a base de heno de alfalfa (14% PC; 1.14 Mcal kg⁻¹ ENm) y silo de maíz (8.1% PC; 1.62 Mcal kg⁻¹ ENm) con libre acceso a agua, sales minerales y sombra. Las cabras fueron estroalmente sincronizadas mediante esponjas intravaginales impregnadas de progesterona. Posteriormente, hacia la fase lútea tardía se realizó el análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica total, considerando FT y CLT. Los promedios generales para FT, CLT y AOT fueron 4.0, 3.09 y 7.09 respectivamente. Mientras que los CLT favorecieron (P=0.07) al grupo BETA, no existieron diferencias (P=0.17) para FT, observándose una diferencia en la AOT a favor (P=0.07) del grupo BETA.

PALABRAS CLAVE: Cabras, Suplementación pre-empadre, Betacaroteno, Actividad Ovárica, Eficiencia Reproductiva.

SUMMARY. This study aimed to evaluate the pre-breeding betacarotene supplementation effect upon total ovarian activity (AOT) considering both the total number of follicles (FT) and corpus luteum (CLT) in goats. This research was carried out at the Southern Goat Research Unit of the URUZA-UACH located between the 25° NL and 103° WL, at 1,117 m. Goats (n=22) were randomly distributed in two experimental groups with homogeneous body weight and condition. Each group was randomly assigned to one of two experimental treatments: 1) Betacarotene, which received a 50 g goat⁻¹ d⁻¹, (BETA, n=10; BW=45.9±5.1 kg), and 2) Control, (CONT, n=12; BW=46.2±5.8 kg). The experimental period considered 34 d pre and 17 d post-ovulation under decreasing photoperiods (October-December 2003). Goats received a diet to cover 100% of the nutritional requirements based on alfalfa hay (14% CP; 1.14 Mcal kg⁻¹ NEm) and corn silage (8.1% CP; 1.62 Mcal kg⁻¹ NEm) with free access to water, mineral salts and shade. Goats were estrually synchronized with intravaginal sponges impregnated with progesterone. Thereafter, during the late luteal phase, a transrectal ultrasonographic scanning of the AOT was performed, considering both FT and CLT. Overall means for FT, CLT and AOT were 4.0, 3.09 and 7.09, respectively. While the CLT number favored (P=0.07) the BETA group, no differences (P=0.17) occurred for FT, with the largest (P=0.07) AOT values depicted by the BETA group.

KEY WORDS: Goats, Pre-breeding supplementation, Betacarotene, Ovarian Activity, Reproductive Efficiency.

INTRODUCCIÓN

La función principal de las gónadas de la hembra es la diferenciación y liberación de ovocitos maduros para la fertilización y la propagación exitosa de las especies. En mamíferos, los ovarios constan de folículos individuales, un profundo oocito u ovocito, células de la

granulosa circundantes, y las capas exteriores de células de la teca. El destino de cada folículo esta controlado por factores de origen endocrinos así como paracrinos (Gougeon, 1996; Greenwald, 1994). El número o pool de ovocitos en el ovario de los mamíferos se establece en la fase fetal, mucho antes de que una hembra inicie su actividad reproductiva. Al nacimiento,

los ovarios cuentan con un número total definido de folículos primarios, cada uno de los cuales incluye ovocito arrestado en profase I de la meiosis y una capa sencilla de la granulosa (Fortune, 1994).

Un incremento en el número de cabritos paridos y destetados por cabra por año permite incrementar la eficiencia en la producción de carne caprina, dando inicio en forma paralela a otro importante aspecto que define la eficiencia económica de la industria caprina como lo es el inicio de la lactancia (Amoah *et al.*, 1996). El número de cabritos nacidos por cabra parida, o tamaño de camada, es un carácter biológico complejo que tiene como límite máximo al número de óvulos liberados o tasa ovulatoria, proceso biológico influido por factores tanto genéticos como ambientales (Montgomery *et al.*, 2001).

Los modelos actuales de selección folicular sugieren que las ovulaciones múltiples están controladas tanto por las concentraciones la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) cerca del momento de selección folicular así como por otros factores de naturaleza intraovárica (McNatty *et al.*, 1999). En el mismo sentido, tanto la actividad ovárica como la tasa ovulatoria son influidas tanto por el nivel nutricional, la alimentación suplementaria, así como por las reservas corporales (Williams *et al.*, 2001).

En efecto una suplementación de corto plazo tanto de proteína como de energía pueden incrementar la tasa ovulatoria, indicando que la respuesta ovárica a la suplementación nutricional es una herramienta que permitiría incrementar la eficiencia reproductiva de la industria caprina. El beta-caroteno es una molécula que actúa como un antioxidante contra la peroxidación de lípidos (Burton e Ingold, 1984), de tal modo que protege el útero y las células esteroidogénicas ováricas del daño oxidativo, además de regular eventos nucleares en tejidos blanco (O'Fallon y Chew, 1984). El objetivo

de la investigación fue determinar el efecto de la suplementación con beta-caroteno en cabras adultas como expresión de mecanismos fisiológicos extra e intra-ováricos que genere un incremento en la tasa ovulatoria total, y si genera en forma paralela mayor eficiencia reproductiva de la hembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento. El estudio se realizó en la Unidad de Experimentación Caprina Sur, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. La Unidad esta ubicada en el municipio de Tlahualilo, Dgo., a 3 Km. de Bermejillo, Durango, y se sitúa entre las coordenadas UTM 639935 E y 2864331 N (Universal Transversa Mercator), correspondiendo a las coordenadas geográficas 25° 53' 31.99" Latitud N y 103° 36' 11.23" Longitud O, con una amplitud de 1,117 msnm.

Condiciones ambientales

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°C, 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.

Animales y su alimentación. Durante el mes de octubre a diciembre del 2002 y bajo un esquema fótico de días cortos, se realizó la formación de los grupos experimentales, considerando 22 cabras encastadas hacia Saanen y Alpina, de 2 años y 10 meses de edad, y con un peso promedio de 46.01±5.05 kg. Se ofreció una dieta a base de heno de alfalfa, ensilado de maíz y maíz rolado en cantidades necesarias para cubrir el 100% de sus requerimientos nutricionales ajustados al peso vivo (NRC, 1998), agua limpia, sales minerales *ad libitum*, y sombra durante todo el periodo experimental

Cuadro 1. Contenido de materia seca (MS, %), energía neta para mantenimiento (ENm, Mkal kg⁻¹) y proteína cruda (PC, %) de los ingredientes de la dieta ofrecida durante el periodo experimental

Ingrediente	MS	ENm	PC
Heno de alfalfa	90	1.14	14.0
Ensilaje de Maíz	33	1.62	8.1
Maíz Rolado	86	2.38	11.2

(51 días). Los grupos experimentales fueron alimentados dos veces al día: heno de alfalfa y ensilaje de maíz por la mañana (0700), y maíz rolado por la tarde (1800) bajo condiciones naturales de luz (Cuadro 1).

Diseño de tratamientos. Las cabras (n=22) fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos con peso promedio homogéneo y fueron asignadas en parejas a cada uno de los 11 corrales. A cada uno de los grupos les fue asignado en forma aleatoria uno de dos tratamientos experimentales: 1) BETA (n=10, PV=45.97±5.14 kg), con suplementación con B-caroteno en una dosis diaria de 50 gr. (C40H56, Syntex SA. de CV.), y 2) CONTROL, sin suplementación (CONT, n=12; PV=46.20±5.87 kg). Las cabras fueron distribuidas considerando cinco y seis corrales para los tratamientos Beta-Caroteno y CONT, respectivamente. Todas las cabras continuaron con su dieta a base de heno de alfalfa durante el periodo experimental. El periodo experimental consideró 34 días antes y 17 días después de la ovulación, del 15 de octubre al 15 de diciembre del 2002, bajo un esquema de fotoperíodo decreciente.

Sincronización del estro. Las cabras fueron estrualmente sincronizadas por medio de implantes de esponjas intravaginales impregnadas de progesterona (Intervet), que haría las veces de un cuerpo lúteo, con un aplicador para inserción Chrono-gest para cordera/cabra (Intervet International B. V., Boxmeer-Holland, Intervet, S. A., France). Nueve días después se retiraron las esponjas como si se tratase de una regresión del cuerpo lúteo y se hizo una aplicación de cloprostenol (Prosolvin C®, Intervet International B. V., Boxmeer-Holland) el cual es un análogo a la prostaglandina F₂.

En dosis de 1 mm por animal (0.075 mg cabra⁻¹) provoca una regresión de cualquier cuerpo lúteo presente en cualquiera de las cabras, provocando una disminución en las concentraciones séricas de progesterona, promoviendo un cambio en la ruta esteroideogénica privilegiando la síntesis y secreción de estradiol, lo cual en turno incrementa la frecuencia del pulso de LH desencadenando la cascada hormonal que da lugar al rompimiento del folículo y liberación del ovocito.

Análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica. El día 17 posterior a la segunda ovulación la actividad ovárica total fue determinada mediante un estudio ultrasonográfico. Previo al análisis ultrasonográfico, las cabras fueron colocadas en una mesa de recumbencia dorsal, y sujetadas a la misma de los miembros 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 gel obstétrico (Lubrel, Arnolds Veterinary Producís, Lid.

USA) al transductor, el cual se colocó dentro de un preservativo de látex estéril aplicando nuevamente gel obstétrico en la superficie del preservativo como lubricante.

El transductor se introdujo en el recto del animal, avanzándolo hasta la línea media del recto, con el rastreador dirigido hacia la parte ventral del animal hasta que la vejiga y el útero fueran identificados con la técnica transrectal con imagen ultrasónica (Griffin y Ginther, 1992; Dickie *et al.*, 1999). Una vez localizadas ambas estructuras, una serie de rotaciones bilaterales fueron realizadas, mientras que el transductor se movía en dirección caudal hasta que ambos fueron localizados. Debido a los movimientos de la cabra, el movimiento generado en el tracto reproductivo dificultó el posicionar los ovarios en la parte media-lateral del útero. En dichos casos, los ovarios fueron identificados por la posición relativa de uno con respecto al otro (Dickie *et al.*, 1999). Todas las evaluaciones ultrasonográficas, fueron realizadas por un experimentado radiólogo, quien desconocía cualquier información previa de la cabra o del tratamiento a la que fue expuesta. El número y tipo de estructuras identificadas en ambos ovarios, es decir folículos mayores y menores a cinco milímetros, folículos totales, así como los cuerpos lúteos presentes, fueron registrados así como fotografiados.

Análisis estadístico. Los pesos corporales, la condición corporal, así como la actividad ovárica considerando el número de folículos y cuerpos lúteos totales, fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) dentro de un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos y 10-12 repeticiones por tratamiento (Snedecor y Cochran, 1967). La separación de medias consideró la opción PDIFF para probar sus diferencias dentro de la opción LSMEANS del PROC GLM. Todos los análisis utilizaron los procedimientos del paquete estadístico SAS (SAS, 1991). Los valores reportados son las medias de mínimos cuadrados ± el error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Peso vivo y condición corporal. Tanto los pesos vivos al inicio y al final, así como la condición corporal al inicio y al final no difirieron (P>0.1) manteniéndose lo más homogéneos, tanto los pesos vivos como las condiciones corporales (Cuadro 2).

No existieron diferencias (P>0.1) para PV o CC, entre los grupos experimentales, por lo que cualquier diferencia en el comportamiento ovárico podría ser atribuible a la acción directa de B-caroteno sobre la fisiología ovárica (Cuadro 3).

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo inicial (PVI, Kg.) y al Ultrasonido (PVUS, Kg.), y condición corporal inicial (CCI, unidades) y al ultrasonido (CCUS, unidades) de los tratamientos Beta-Caroteno y CONT (n = 12) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (25° LN)

	Beta-Caroteno	CONT	NS0 ¹	EE ²
PVI	45.6	45.1	0.8	1.4
CCI	3.04	2.9	0.39	0.08
PVUS	44.8	45.3	0.8	1.4
CCUS	3.25	3.3	0.4	0.08

¹ Nivel de significancia observado.

² Error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador.

Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV, Kg), condición corporal (CC, unidades), folículos totales (FT, unidades), cuerpos lúteos totales (CLT, unidades), y actividad ovárica total (AOT, unidades), en cabras suplementadas con B-caroteno y cabras control (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (25° LN)

	Beta-Caroteno	CONT	NS01	EE2
PV	44.8	45.3	0.8	1.4
CC	3.25	3.3	0.45	0.08
FT	4.6	3.5	0.17	0.58
CLT	3.4	2.8	0.07	0.22
AOT	8.0	6.3	0.07	0.67

¹ Nivel de significancia observado.

² Error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador.

Folículos totales, cuerpos lúteos totales, y actividad ovárica total. El promedio general para folículos totales (FT) fue 4.1 ± 0.6 , no existiendo diferencias ($P > 0.1$) entre los grupos CONT y BETA para dicha variable. Con respecto a la variable cuerpos lúteos totales (CLT), se observó una media general de 3.1 ± 0.2 , existiendo diferencias ($P = 0.07$) entre tratamientos para dicha variable en favor del grupo BETA. En el mismo sentido, el promedio global para actividad ovárica total (AOT) fue 7.15 ± 0.6 , observándose una diferencia ($P < 0.08$) entre tratamientos a favor del grupo BETA (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos indican que cabras suplementadas con B-caroteno mostraron una mayor actividad ovárica total. En el mismo sentido, dicho efecto de suplementación sobre la actividad ovárica no puede ser atribuible a algún efecto de la condición corporal al inicio (CCI), o el peso vivo (PV), ya que dichas

variables mostraron un comportamiento homogéneo entre los grupos experimentales.

Bajo condiciones metabólicas normales alrededor del 2-5% del oxígeno consumido por la mitocondria se convierte en especies reactivas de oxígeno (Lopaczynki y Zeisel, 2001). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS: H_2O_2 , O_2 , OH, NO) alteran diversos procesos fisiológicos, condición conocida como estrés oxidativo (Miller, *et al.*, 1993). Esta condición ocurre a nivel celular, cuando las especies reactivas de oxígeno son producidas rápidamente y no pueden ser removidos por los mecanismos de defensa antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 1994) o cuando los ROS exceden la capacidad de dichos antioxidantes (Miller, *et al.*, 1993). La producción excesiva de radicales libres puede alterar algunos procesos asociados con la fertilidad como son la síntesis de esteroides (Staats, *et al.*, 1988 ; Young,

et al., 1995), prostaglandinas (Hemler y Lands, 1980), o incluso en la motilidad espermática (Alvarez y Storey, 1989). El B-caroteno estimula la producción de progesterona por colagenasa dispersa en los porcinos (Talavera y Chew, 1986) y células lúteas bovinas *in vitro* (Talavera y Chew, 1987).

En cerdos inyectados con B-caroteno, se observó la presencia de B-caroteno dentro de los componentes subcelulares de sus células de la granulosa, células lúteas y endometrio (Chew *et al.* 1990 a y b), así como en la glándula adrenal y el cuerpo lúteo (Schweigert *et al.*, 2001). Tanto las adrenales como el cuerpo lúteo son glándulas endocrinas las cuales dependen para la síntesis de esteroides del colesterol exógeno el cual es captado mediante los receptores del sistema de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) junto a otros compuestos como fosfolípidos, triglicéridos, vitamina E y B-caroteno, por lo que es común observar un acumulo de dichos compuestos en adrenales y cuerpo lúteo (Schweigert *et al.*, 2001).

Lo anterior confirma el efecto benéfico del B-caroteno sobre la actividad de los principales grupos celulares del ovario, ya sea en sus fases lútea o folicular, y coincide con lo observado en el presente estudio, ya que las cabras suplementadas con B-caroteno mostraron la mayor tasa ovulatoria (CLT) así como la mayor actividad ovárica total. Al respecto se ha reportado que el B-caroteno actúa como un antioxidante contra la peroxidación de lípidos (Burton y Ingold, 1984), protegiendo a varias estructuras reproductivas de daño oxidativo (O'Fallon y Chew, 1984), demostrando ser un molécula cuya acción ovárico-protectora optimiza el comportamiento reproductivo.

En bovinos, la administración de B-caroteno reguló positivamente el ambiente uterino o respuesta endocrina en vaquillas quienes mostraron mayores cantidades de proteínas uterinas específicas al día 15 de preñez (Chew *et al.*, 1982). En porcinos, la inyección de B-caroteno generó su expresión en los componentes subcelulares en las células de la granulosa, células lúteas y el endometrio (Chew *et al.*, 1990 a y b). Durante la fase lútea, el B-caroteno muestra acciones luteoprotectoras al disminuir daños estructurales o funcionales ocasionados por la presencia de moléculas de oxígeno reactivos, además de promover una actividad esteroideogénica óptima.

Similarmente en vaquillas inyectadas semanalmente con 228 mg de B-caroteno iniciando el día de empadre y continuando durante el destete a 3 semanas posparto tuvieron una menor mortalidad embrionaria, mayor tamaño de carnada, y crías al nacimiento y al destete

mas pesadas que aquellas vaquillas no suplementadas (Brief y Chew, 1985). En monogástricos, la suplementación de B-caroteno en la dieta de caninos aumentó los niveles plasmáticos de P4 (Weng *et al.*, 2000), mientras que en bovinos, los niveles de B-caroteno, en plasma, cuerpo lúteo y fluido folicular correlacionaron positivamente con los niveles plasmáticos de P4 (Haliloglu *et al.*, 2002).

En humanos, Katz *et al.* (2001) reportaron una incrementada prolificidad (tasa de cuateo) y(o) una mayor tasa de sobrevivencia *in utero* en mujeres suplementadas con beta-caroteno previo al momento de la concepción y durante la preñez. Al respecto, Olsen (2001) mencionó que en dicho estudio no fue posible definir si el efecto del B-caroteno fue debido a una mayor tasa de partos gemelares, a un aumento en la tasa de sobrevivencia de camadas mayores, ó a diferencias en el número de gemelos monocigóticos o dicigóticos.

CONCLUSIONES

La suplementación diaria de 50 gramos de B-caroteno previo al empadre en cabras adultas incrementó la actividad ovárica medida como el número de cuerpos lúteos totales así como sobre la actividad ovárica total, considerando la suma de cuerpos lúteos y folículos.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, J.G. and Storey, B.T. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90.
- Amoah, E.A.; Gelaye, S.; Guthrie P. and Rexroad, C.E. 1996. Breeding season and aspects of reproduction of female goats. *J. Anim. Sci.* , 74:723-728.
- Burton, G. W. and Ingold, K. U. 1984. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:569-573.
- Brief, S. and Chew, B.P. 1985. Effects of vitamin A and b-caroteno on reproductive performance in gilts. *J. h i m . Sci.* 60:998. *Biochem. J.* 122:235.
- Chew. B. P.; Rasmussen, H.; Pubols, M.H. and Preston, R.L. 1982. Effect of vitamin A and b-carotene on plasma progesterone and uterine protein secretion in gilts. *Theriogenology* 18:643-654.
- Chew, B. P.; Wong, T.S.; Michal, J.J.; Standaert, F.E. and Heirman, L.R. 1990a. Kinetic characteristics of b-carotene uptake after injection of b-carotene in pigs. *J. Anim. Sci.* 69:4883.
- Chew, B. P.; Wong, T.S.; Michal, J.J.; Standaert, F.E. and Heirman, L.R. 1990b. Subcellular distribution of b-carotene, retinol and μ -tocopherol in porcine lymphocytes after single injection of b-carotene. *J. Anim. Sci.* 69:4892.
- Dickie, A.M.; Paterson, C.; Anderson, L.M. and Boyd, J.S. 1999. Determination of corpora lutea numbers in

- Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology* 51: 1209-1224.
- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals *Biology of Reproduction* 50: 225-232
- Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17:121-155
- Greenwaid G, Roy SY 1994. Follicle development and its control. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 629-724.
- Griffin, J.K. and Ginther, O.J. 1992. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology *J. Anim.Sci.* 70: 953-972.
- Gutteridge, JMC.; Halliwell, B. 1994. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford Univ Press, Oxford.
- Hemler, M.E. and Lands, W.E.M. 1980. Evidence for a peroxide - initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem*:225:6253-6261.
- Lopaczynki, W. and Zeisel, S.H. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*:21:295 - 307.
- McNatty, K.P.; Heath, D.A.; Lundy, T.; Fidler, A.E.; Quirke, L.; O'Connell, A.; Smith, P.; Gromme, N. and Tisdall, D.J. 1999. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil.* 54:3-16.
- Miller, J.K.; Brezezka – Siebodzinska, E. and Madsen, F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci*:76:2812 - 2823.
- Montgomery, G.W.; Galloway, S.M.; Davis, G.H. and McNatty, K.P. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*,121:843-852.
- O'Fallon, J. V. and Chew, B.P. 1984. The subcellular distribution of b-carotene in bovine corpus luteum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177:406-411.
- SAS. 1991 SAS SAT users guide. SAS institute, Inc. Cary, N.C.
- Schweigert, F.J.; Buchholz, I.; Schyhmacher, A. and Groppe, J. 2001. Effect of dietary B-carotene on the accumulation of B-carotene and vitamin A in plasma and tissues of gilts. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41:47-55.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967 *Statistical Methods*. 6th Ed. The Iowa state univ. Press, Ames.
- Staats, D.A.; Lohr, D.P. and Coiby, H.D. 1998. Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology*,123:975.
- Talavera, F. and Chew, B.P. 1986. In vitro interaction of lipoproteins with retinol, retinoic acid and beta -carotene on progesterone secretion by bovine luteal cells. *J. Dairy Sci.* 70 (Suppl. 1):225 (Abstr.).
- Talavera, F. and Chew, B.P. 1987. Comparative role of retinol, retinoic acid and beta -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro. *J. Reprod. Fertil* 82:611.
- Young, F.M.; Luderer, W.B. and Rodger, R.J. 1995. The antioxidant B-carotene prevents covalent cross - linking between cholesterol side - chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cell. *Mol Cell Endocrinol*:109:113-118.
- Williams, S.A.; Blache, D.; Martin, G.B.; Foot, R.; Blackberry, M.A., and Scaramuzzi, R.J. 2001. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction*. 122:947-956.