

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO SOBRE LA EFICIENCIA
REPRODUCTIVA EN CABRAS JÓVENES Y ADULTAS: ACTIVIDAD OVÁRICA
Y HORMONAS METABÓLICAS

Tesis

Que presenta GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ

como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Torreón, Coahuila

Octubre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO SOBRE LA EFICIENCIA
REPRODUCTIVA EN CABRAS JÓVENES Y ADULTAS: ACTIVIDAD OVÁRICA
Y HORMONAS METABÓLICAS

Tesis

Que presenta GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ

como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS


Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Director UAAAN


Dr. Cesar Alberto Meza Herrera
Director externo (UACH-URUZA)

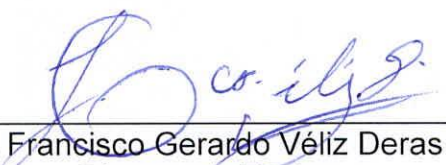
Torreón, Coahuila

Octubre, 2025

SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO SOBRE LA EFICIENCIA
REPRODUCTIVA EN CABRAS JÓVENES Y ADULTAS: ACTIVIDAD OVÁRICA
Y HORMONAS METABÓLICAS

Tesis

Elaborada por GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



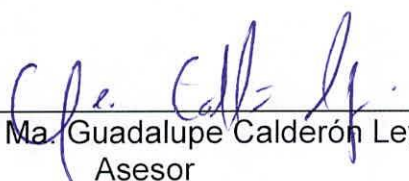
Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Director de Tesis



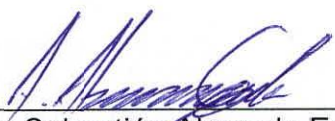
Dr. Cesar Alberto Meza-Herrera
Asesor



Dr. José Luis Reyes Carrillo
Asesor



Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva
Asesor



Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefa del Departamento Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, la paciencia en todo este lapso de tiempo.

Agradezco infinitamente a mí amada esposa e hijos y hermanos y a mis queridos amigos estar pendientes de mi persona.

Agradezco a mis asesores y colaboradores para la realización y presentación de esta tesis.

Esencialmente a mis estimados y queridos amigos, César Alberto Meza Herrera y Francisco Gerardo Véliz Deras.

DEDICATORIA

A MC. MARIA BLANCA ESTELA PERALES DE ARELLANO Mi amada esposa que siempre cree en mí, GRACIA PARA TÍ.

A mis hijos amados, BLANCA CECILIA, MALINALI, GERARDO, SANDRA, MARÍA REGINA, MARÍA EMILIA, CARLA, JUAN PABLO y LEONARDO.

A la memoria de mis amados padres con cariño,

Sra. MARÍA CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ IBARRA.

Don JOSÉ ARELLANO SANTIBÁÑEZ, “El mejor ganadero que he conocido”

A mis queridos hermanos,

JUAN JOSÉ, MARÍA ISABEL, JESÚS ALBERTO, FERNANDO, FRANCISCO JAVIER, NORA ALICIA, MARTHA VIANEY, MARÍA GLORIA y DANTE HUGO.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Estacionalidad reproductiva.....	4
3.1.1. Control fotoperiódico	6
3.1.2. Neuroendocrinología de la estacionalidad	7
3.1.3. Regulación de la reproducción estacional por Kisspeptina	12
3.1.4. Aspectos nutricionales y su relación con la reproducción estacional	13
3.2. Mecanismos neuroendocrinos de la reproducción.....	18
3.2.1. Eje hipotálamo-Hipófisis-Gonadal	19
3.2.2. Rol de las kisspeptinas en el proceso reproductivo	26
3.3. El betacaroteno.....	28
3.3.1. Estructura y propiedades químicas de los carotenoides	29
3.3.2. Contenido de betacaroteno en forrajes	31
3.3.3. Metabolismo Retinoide.....	34
3.3.4. Conversión enzimática de carotenoides proretinoides en retinoides	34
3.3.5. Esterificación de retinol por enterocitos.....	35
3.3.6. Quilomicrones y su metabolismo en la circulación	36
3.3.7. Metabolismo hepático retinoide.....	37
3.3.8. Requerimientos de Vitamina A, referidos en betacaroteno en cabras lecheras.....	39
3.3.9. Betacaroteno como Antioxidante	40
3.3.10. Respuesta a la suplementación de betacaroteno en animales	42
4. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	46
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	57
6. LISTA DE REFERENCIAS	58

Figura 1. Calendario de reproductores estacionales de días cortos (Adaptado de Gu et al., 2019).	5
Figura 2. Esquema del tracto fotoneuroendocrino en reproductores de días largos y días cortos (Tomado de Bustos Obregón y Torres-Díaz, 2012).	8
Figura 3. Estacionalidad reproductiva en reproductores de días largos y días cortos (Tomado de Calderón-Leyva, 2017).	11
Figura 4. Cambios anuales en el fotoperiodo (a), lluvia (b), disponibilidad de alimento (c) y fertilización (d) de cabras locales del subtrópico de México mantenidas en contacto con machos en condiciones naturales de pastoreo (Adaptado de Delgadillo, 2010).	16
Figura 5. Variaciones estacionales en el peso testicular (a), concentraciones plasmáticas de testosterona (b), número total de espermatozoides por eyaculado (c) y motilidad progresiva de los espermatozoides (d) en machos cabríos locales bien alimentadas y confinados en el subtrópico de México mantenidos en un corral abierto y sometidas a cambios fotoperiódicos y de temperatura naturales (Adaptado de Delgadillo, 2010). ..	17
Figura 6. Fórmulas estructurales del betacaroteno y sus metabolitos	31

Índice de cuadros

Cuadro 1. Requerimientos de vitamina A para el mantenimiento y suma de mantenimiento y ganancia de peso de cabras lecheras en crecimiento, expresados en RE d ⁻¹ y Betacaroteno mg d ⁻¹ , de acuerdo a la NRC, 2007.	40
--	----

RESUMEN

Suplementación de Betacaroteno sobre la eficiencia reproductiva en cabras jóvenes y adultas: actividad ovárica y hormonas metabólicas

Gerardo Arellano Rodríguez
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Director de Tesis

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que presenta varias actividades biológicas de importancia nutricional y fisiológica, como precursores de la vitamina A ó retinol. El ácido retinoico modula diversos productos genéticos relacionados con el rendimiento reproductivo, sin embargo, se ha propuesto que el betacaroteno podría actuar de manera directa, independientemente de la vitamina A. Sobre estas bases nos hemos planteado la hipótesis de que la suplementación con betacaroteno podría estar asociada con la eficiencia reproductiva en cabras jóvenes y adultas, midiendo la actividad ovárica total y la posible relación del betacaroteno con cambios en el perfil de hormonas reproductivas, metabólicas y metabolitos sanguíneos. Se realizaron dos experimentos para evaluar el rol del betacaroteno sobre la función reproductiva en cabras. En el experimento 1 (Exp. 1) se evaluó el efecto de la suplementación con betacaroteno sobre la actividad ovárica. Se utilizaron 22 cabras adultas (34 meses de edad) las cuales fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: 1) Betacaroteno (BETA, n= 10) y 2) Control (CONT, n= 12). Las cuales fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con Acetato de Fluorogestona (FGA). Las cabras del grupo BETA recibieron 50 mg de betacaroteno diariamente durante 35 días pre y 17 días post-ovulación. Una vez que la ovulación ocurrió, hacia el final de la fase lutea (día 18) se realizó ultrasonido a todas las cabras para evaluar el total de folículos (FT), numero de cuerpos lúteos (CL) y la actividad ovárica total (AOT). Las cabras del grupo BETA tuvieron una mayor actividad ovárica ($P=0.07$). En el experimento 2 (Exp. 2) se analizó el efecto de la suplementación con betacaroteno sobre el número y

volumen de cuerpos lúteos, así como la síntesis de progesterona. Como en el experimento 1, las cabras fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos experimentales. Las cabras fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con Acetato de Fluorogestona (FGA). En el grupo 1 (n= 10) las cabras recibieron 50 mg de betacaroteno diariamente 35 días antes y 15 días después de la ovulación mientras que las cabras del grupo control (n= 12) no recibieron ningún tipo de suplementación. Los días 4, 8, 12 y 16 post ovulación se tomó una muestra sanguínea de las cabras para medir los niveles de P4 en sangre y el día 18 se realizó ultrasonografía para evaluar el número y el volumen del CL. Las cabras suplementadas con betacaroteno presentaron un mayor número de CL ($p=0.07$) y mayores niveles de progesteron sérica ($p=0.05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($p=0.53$) en el volumen de CL entre ambos grupos. Estos resultados sugieren que la suplementación con betacaroteno afecta positivamente la actividad ovárica en las cabras. El betacaroteno mejora la función ovárica al incrementar la actividad ovárica total, así como la síntesis de progesterona. Lo anterior es esencial para la implantación y sobrevivencia embrionaria durante el periodo del reconocimiento materno de la gestación. Lo anterior es relevante ya que podría ayudar a disminuir las pérdidas tempranas de la gestación en los caprinos.

Palabras clave: Reproducción, Actividad ovárica, Carotenoides, Hormonas metabólicas y Metabolitos sanguíneos.

ABSTRACT

Effect of beta-carotene supplementation upon reproductive efficiency in young and adult goats: ovarian activity and metabolic hormones

Gerardo Arellano Rodríguez
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Director de Tesis

Carotenoids are a group of pigments that present several activities of nutritional and physiological importance, as precursors of vitamin A or retinol. Retinoic acid modulates various genetic products related to reproductive performance, however, studies have proposed that betacarotene could act directly, independently of vitamin A. On these grounds we have hypothesized that supplementation with betacarotene could be associated with reproductive efficiency in young and adult goats, measuring total ovarian activity and the possible relationship of betacarotene with changes in the profile of reproductive and metabolic hormones and blood metabolites. Two experiments were conducted to evaluate the role of beta-carotene on reproductive function in goats. In experiment 1 (Exp. 1) the effect of beta-carotene supplementation on ovarian activity was evaluated. Twenty-two adult goats (34 months old) were used, which were randomly assigned to two experimental groups: 1) Beta-carotene (BETA, n = 10) and 2) Control (CONT, n = 12). The goats of both groups were synchronized with intravaginal sponges impregnated with Fluorogestone Acetate (FGA). Goats in the BETA group received 50 mg of beta-carotene daily for 35 days before and 17 days post-ovulation. Once ovulation occurred, towards the end of the luteal phase (day 18) an ultrasound was performed on all the goats to evaluate the total number of follicles (FT), number of corpora lutea (CLT) and total ovarian activity (AOT). The goats of the BETA group had a higher ovarian activity ($P = 0.07$). In experiment 2 (Exp. 2) the effect of beta-carotene supplementation on the number and volume of corpora lutea, as well as the synthesis of progesterone, was evaluated. As in experiment 1, the goats were randomly assigned into two

experimental groups. The goats were synchronized with intravaginal sponges impregnated with Fluorogestone Acetate (FGA). In group 1 (n = 10) the goats received 50 mg of beta-carotene daily 35 days before and 15 days after ovulation, while the goats in the control group (n = 12) did not receive any type of supplementation. On days 4, 8, 12 and 16 post-ovulation, a blood sample was taken from the goats to measure the levels of progesterone in the blood and on day 18 an ultrasound was performed to evaluate the number and volume of CL. Goats supplemented with beta-carotene presented a higher number of CL ($p = 0.07$) and higher levels of serum progesterone ($p = 0.05$). However, no significant differences ($p = 0.53$) were observed in CL volume between both groups. The results suggest that beta-carotene supplementation positively affects ovarian activity in goats. Beta-carotene improves ovarian function by increasing total ovarian activity, as well as the synthesis of progesterone. This is essential for embryo implantation and survival during the period of maternal recognition of pregnancy. This is relevant as it could help reduce early pregnancy losses in goats.

Keywords: Reproduction, Ovarian activity, Carotenoids, Reproductive and metabolic hormones and Blood metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

En los pequeños rumiantes se conoce que una inadecuada nutrición se caracteriza por perfiles metabólicos y endocrinos deficientes, por su parte, estos pueden comprometer el rendimiento reproductivo de los animales, lo que puede originar un retraso en la pubertad, irregularidad en los ciclos estrales y una caída en la efectividad reproductiva general (Popwell *et al.*, 1996; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Meza-Herrera *et al.*, 2007). En efecto, la nutrición es considerada el principal modulador de la reproducción, además de que el crecimiento de los folículos y la maduración de ovocitos dependen principalmente de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH) así como, también de algunos otros factores intraováricos (p. ej., IGF-I). Antes, la función del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG) es modificada por las entradas neuronales, gobernada por las señales fotoperiódicas, que modulan la actividad de las terminales neuronales liberadoras de GnRH en el hipotálamo teniendo una repercusión en la homeostasis energética (Meza-Herrera *et al.*, 2013)

Se ha reportado que la influencia de la estacionalidad reproductiva puede ser alterada por el entorno nutricional, con un período de reproducción más largo en cabras con mayor nivel nutricional, lo que se refleja en mejores puntajes de condición corporal y peso vivo. Existe evidencia de que en el ganado criollo mexicano que se mantiene en las latitudes tropicales la duración del período de anovulación se modula parcialmente por el estado de energía nutricional (Gallego-Calvo *et al.*, 2014). Al respecto también existe relación entre mediadores endocrinos, el estado nutricional y la reproducción; por ejemplo, el factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-I), la hormona del crecimiento y su relación con la insulina, la glucosa regula la liberación de GnRH además de que participan en el control del metabolismo de energía en el cerebro (Arroyo, 2011).

Los carotenoides son pigmentos en la naturaleza, los cuales, están presentes en los organismos fotosintéticos y no fotosintéticos así como en bacterias, algas, hongos, insectos y animales y son responsables de la mayoría de los colores rojo

a amarillo de mucha hojas, frutas, flores y peces. En los animales, presentan varias actividades biológicas importantes relacionado al estado nutricional y fisiológico (Fraser y Bramley, 2004; Nozière *et al.*, 2006; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2008).

Los carotenoides, por otro lado, son de suma importancia en los humanos y los animales como precursores de la vitamina A (Chew *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 2000; Schweigert *et al.*, 2003). Los β -carotenos, que están presentes en plantas verdes, pero también puede sintetizarse químicamente, ha demostrado tener un papel clave en una amplia gama de procesos biológicos (Schweigert, 1998). Aunque se sabe que muchos productos genéticos relacionados con el rendimiento reproductivo están modulados por el ácido retinoico, el producto de la oxidación del retinol (Harrison *et al.*, 2012), otros estudios han propuesto que el betacaroteno podría actuar de manera directa, independientemente de la vitamina A (Kawashima *et al.*, 2010, 2012; Kramer y Aurich, 2010). Sobre la base de tales hallazgos y estudios previos, nosotros planteamos la hipótesis de que la suplementación con betacaroteno podría estar asociada con la eficiencia reproductiva en cabras jóvenes y adultas, midiendo la actividad ovárica total y la posible relación del betacaroteno con cambios en el perfil de hormonas reproductivas, metabólicas y metabolitos sanguíneos.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la suplementación de Betacaroteno sobre la eficiencia reproductiva en cabras jóvenes y adultas, midiendo la actividad ovárica total y la posible relación del Betacaroteno con hormonas reproductivas, metabólicas y metabolitos sanguíneos.

2.1. Objetivos específicos

1. El efecto de la suplementación con Betacaroteno sobre la tasa de ovulación, número de cuerpos lúteos, el volumen lúteo total y la secreción pulsátil de LH en cabras hembras adultas.
2. Evaluar los efectos de un suplemento nutricional de Betacaroteno a corto plazo sobre la secreción de P4 y los niveles séricos de GH e IGF-1.
3. Evaluar la posible relación entre la suplementación con Betacaroteno y algunos metabolitos sanguíneos relacionados con el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas.
4. Evaluar la posible relación con respecto a la suplementación con Betacaroteno y la Triyodotironina sérica al inicio de la pubertad.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Estacionalidad reproductiva

La rotación de la tierra impone fluctuaciones predecibles en el medio ambiente en escalas de tiempo diarias y anuales. Estos cambios cíclicos han impactado profundamente la evolución. La capacidad de realizar oportunamente funciones específicas proporciona una ventaja adaptativa significativa que mejora el estado físico. Por lo tanto, los organismos desarrollaron mecanismos de temporización endógenos para mantenerse en sintonía con su entorno, anticipar los próximos cambios y mostrar la respuesta fisiológica adecuada en el momento adecuado (Dardente *et al.*, 2016).

Los primeros humanos fueron nómadas y se adaptaron a la disponibilidad estacional de productos animales. A lo largo del proceso de domesticación, se perdió la estacionalidad de muchos productos ganaderos. Sin embargo, los productos como la leche y la carne proporcionados por la cría de ovejas y cabras permanecieron estacionales en muchas regiones del mundo (Balaro *et al.*, 2018).

Los animales de granja muestran diferencias en algunos parámetros de producción, contribuyendo de este modo la disponibilidad de productos de origen animal frescos (carne, leche y queso). Esto es debido, a que ovejas y cabras, son reproductores de días cortos, se reproducen durante el otoño. Debido a que estos animales tienen un período de gestación de aproximadamente cinco meses, sus crías también nacen y se crían durante la primavera y el verano (Guh *et al.*, 2019) teniendo así una más o menos marcada época de nacimiento, donde aseguran la supervivencia de su prole (figura 1), siendo esta una de las ventajas de la reproducción estacional donde los animales pueden evitar gastar energía para la reproducción en una época inapropiada del año (por ejemplo, en el invierno), y la supervivencia de la descendencia se maximizará si son paridos y criados en estaciones con un clima moderado (Balaro *et al.*, 2018; Guh *et al.*, 2019).

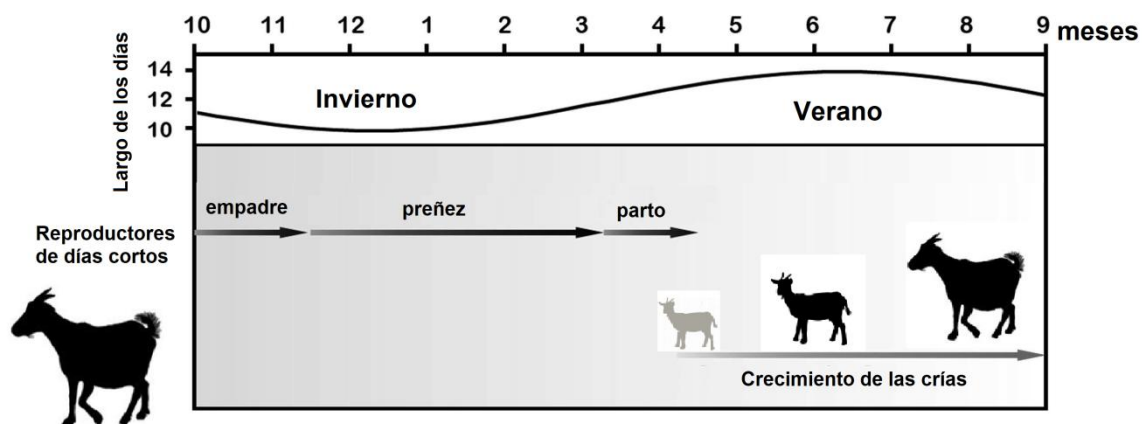


Figura 1. Calendario de reproductores estacionales de días cortos (Adaptado de Gu et al., 2019).

Algunas especies tienen variaciones estacionales sobre la frecuencia de ovulación (presencia o ausencia), la espermatogénesis (disminución a ausencia), la calidad del gameto (variaciones de fertilización y supervivencia embrionaria) y del comportamiento sexual (Chemineau *et al.*, 2008). En ovejas y cabras además de ser reproductoras estacionales la actividad reproductiva es dependiente de las hormonas, en varios casos el entorno social puede ejercer alguna acción moduladora (Veliz *et al.*, 2002). En ovinos y caprinos el fotoperíodo es el principal en la regulación de la actividad reproductiva (Chemineau *et al.*, 2008).

Es complicado superar la estacionalidad intrínseca del estro en las cabras, pero se han logrado cambios que son operativos, aumentando el entendimiento de la fisiología reproductiva, y la reproducción estacional de la cabra mediante el desarrollo gradual de tecnologías de la reproducción (Luo *et al.*, 2019).

En cabras, hay variables extrínsecas (los cambios estacionales) e intrínsecas (tamaño corporal, la duración reproductiva). Los principales factores que participan en la reproducción son temperatura, humedad, cantidad y distribución de lluvias, radiación solar, fotoperíodo, nutrición, manejo del sistema de producción y las interacciones sociales entre individuos dentro de la misma población (Chemineau *et al.*, 2008; Gallego-Calvo *et al.* 2014; Delgadillo *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2016). La asociación de todos ellos parecen ser componentes esenciales en la plasticidad cerebral (Balara *et al.*, 2018).

3.1.1. Control fotoperiódico

Aunque el fotoperíodo es una señal importante, la naturaleza de la respuesta a un fotoperíodo determinado depende de la especie. Por lo tanto, para las ovejas y las cabras, el fotoperíodo corto se asocia con una mayor competencia reproductiva, lo que significa que la "temporada de reproducción" es durante el otoño, lo que permite que las crías nazcan 5 meses más tarde en los cálidos días de la primavera, cuando la disponibilidad de alimentos es óptima. El fotoperíodo corto también se asocia con una menor ingesta de alimentos y una disminución del peso corporal (Helfer *et al.*, 2018). Aunque estos efectos, no son permanentes, cuando están sujetos a un fotoperíodo los animales se vuelven "refractarios", del fotoperíodo: los días largos dejan de ser inhibidores, y los días cortos dejan de estimular (Malpaux *et al.*, 1998; Chemineau *et al.*, 2010). En cabras y borregas, esto podría ser considerado conceptualmente como el primer paso n del ritmo circanual, el cual puede ser sobrepasado por animales en transferencia del fotoperíodo opuesto (Malpaux *et al.*, 1998), conocido como refracción a los días cortos, lo cual ocurre de manera natural en borregas durante finales de invierno, y se rompe por dos meses de exposición a días largos en diciembre-enero, permitiendo que la eficacia de los días cortos se restablezca (Arrebola *et al.*, 2010).

En caprinos de climas templados, el fotoperíodo y sus variaciones determinan los cambios estacionales de la actividad neuroendocrina. Por intermedio de la duración de la secreción de melatonina. Los días cortos estimulan la actividad pulsátil de LH y los días largos la inhiben. La testosterona comienza a elevarse desde la cuarta semana después de los días cortos y disminuye la segunda semana después de los días largos (Chemineau y Delgadillo, 1993).

3.1.2. Neuroendocrinología de la estacionalidad

Hay una marcada relación entre el ambiente y la conducta reproductiva, en los reproductores estacionales, de acuerdo a factores proximales, especialmente el fotoperiodo que provoca cambios fotoneuroendocrinos (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

En los mamíferos, la retina transmite información fotoperiódica a los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos en el sistema nervioso central (SNC). El SNC alberga el reloj circadiano principal, que sincroniza una miríada de relojes centrales y periféricos a través de vías neurales y humorales. En el contexto de la estacionalidad, el control diario ejercido por el SNC sobre la glándula pineal es de suma importancia ya que da forma al patrón nocturno de producción de melatonina (figura 2); por lo tanto, la melatonina lleva un mensaje diario y estacional a los tejidos que expresan sus receptores específicos MT1 y MT2. Múltiples tejidos en todo el cuerpo, incluidas varias regiones del cerebro, expresan estos receptores, particularmente el subtipo MT1. Sin embargo, una sola región es común en todas las especies y muestra invariablemente la expresión MT1 más fuerte de todos los tejidos examinados: la pars tuberalis (PT), que constituye la parte rostral de la hipófisis anterior. Debido a que el papel fundamental de la PT en el control estacional de la prolactina (PRL) y las gonadotropinas (LH y FSH) (Dardente *et al.*, 2016). Las gonadotropinas, así como la secreción de melatonina, intervienen en esta regulación (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

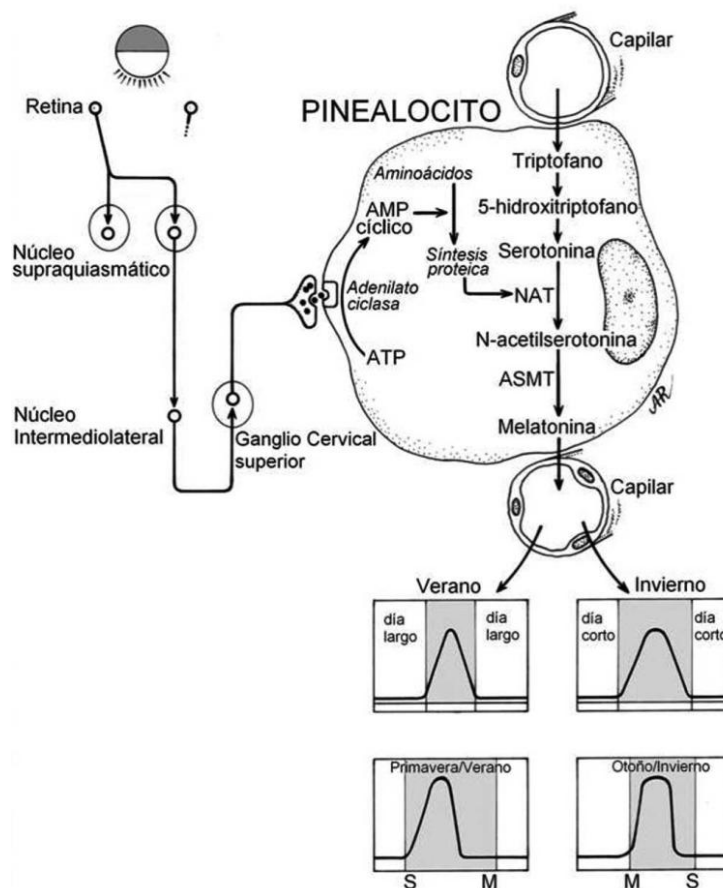


Figura 2. Esquema del tracto fotoneuroendocrino en reproductores de días largos y días cortos (Tomado de Bustos Obregón y Torres-Díaz, 2012).

Los endocrinocitos establecen un asa de retroalimentación con la adenohipofisis y el hipotálamo en un circuito de asa larga, corta y ultracorta. Los sustentocitos son importantes por su rol mecánico, trófico y metabólico respecto a la secreción de la activina e inhibina (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

Como reproductores estacionales, los machos cabríos también muestran grandes cambios en la actividad sexual. La temporada de reproducción de los machos cabríos comienza a principios del otoño y termina a fines del invierno. El

comportamiento sexual, el tamaño testicular, un índice de la actividad espermatogénica y la producción de esperma cuantitativa y cualitativa disminuyen dramáticamente durante la temporada no reproductiva. La evaluación de las funciones reproductivas de los machos cabríos se realiza generalmente entre los 7 y 9 meses de edad en un corral individual en 15 colecciones de semen durante el comienzo de la temporada de cría, de los machos jóvenes se recolecta dos veces por semana, mientras que de los machos adultos se pueden recolectar de 3 a 5 veces por semana (Luo *et al.*, 2019).

En el macho también se refleja la estacionalidad en testosterona y el tamaño testicular (Santiago-Moreno *et al.*, 2005). La actividad sexual del macho es de mayo a diciembre (verano – otoño) seguida de un periodo de reposo sexual de enero a abril (invierno - primavera). Existe una variación marcada según la estación del año en que se encuentren (Chemineau *et al.*, 2010). Durante el reposo sexual, la LH, testosterona, el peso testicular y la producción espermática reducen (Delgadillo *et al.*, 2001), por lo tanto, el comportamiento sexual de los machos reduce y las copulaciones pueden desaparecer totalmente. Esta estacionalidad depende de las variaciones anuales del fotoperiodo (Duarte *et al.*, 2010); esta acción se genera a nivel de eje hipotálamo-hipofisario-gonadal mediante la glándula que recibe las variaciones de horas luz (Chemineau *et al.*, 1993).

La melatonina, mantiene un patrón circadiano caracterizado por niveles basales durante el día y elevados durante la noche. Las variaciones en la secreción de esta hormona reflejan el fotoperiodo (Malpoux *et al.*, 1998) regulando la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que a su vez regula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Clarke y Caraty, 2013). El principal mecanismo de regulación de la estacionalidad por parte de la melatonina se efectúa mediante una modulación, a nivel hipotalámico. La disminución en la secreción de melatonina determina un incremento a la acción inhibitoria de los esteroides gonadales, estableciéndose una inhibición de la actividad reproductiva (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

El inicio del incremento del tamaño testicular y de la secreción de testosterona en el mes de septiembre, coincide con los grupos mixtos y las luchas entre machos, que establecerán el orden en la cubrición de las hembras en el mes de octubre. Este mecanismo está orientado a conseguir el nivel mayor de testosterona y producción espermática. Sin embargo, al final de la estación reproductiva hay una disminución en la producción seminal, los machos pueden mantener una capacidad de fecundación, y poder cubrir a aquellas hembras que no quedaron gestantes con las primeras ovulaciones de otoño (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

A nivel testicular, la FSH controla la actividad de las células de Sertolí, regulando la espermatogénesis y la secreción de inhibina (Lincoln *et al.*, 1990). El incremento de la frecuencia de los pulsos de LH durante el otoño, tiene un efecto de retroalimentación negativo de la testosterona, que permitirá un adecuado desarrollo de las glándulas accesorias (Santiago-Moreno *et al.*, 2005).

La reactivación gonadal origina un aumento en el peso testicular durante el periodo verano-otoño, a nivel celular se constata un aumento del volumen de las células de Leyding con un incremento del tamaño del núcleo (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012).

Aunque de alguna manera, la actividad espermatogénica y el comportamiento sexual de los machos cabríos están presentes, varían con la estación (Chemineau *et al.*, 2010). Los cambios se originan por la glándula pituitaria (Rosa y Bryan, 2002), la cual, es controlada en el sistema portal-cerebral a nivel pituitario (Chemineau y Delgadillo, 1993). La frecuencia de la liberación de GnRH es un mensaje esencial para controlar todo el eje hipotálamo hipofisiario–gonadal (Thiery *et al.*, 2009). Estos cambios son accionados por el fotoperiodo y la melatonina (Malpaux *et al.*, 2001), que actúa como sincronizadora del ritmo endógeno de la reproducción (figura 3) (Thiery *et al.*, 2009; Calderón-Leyva, 2017).

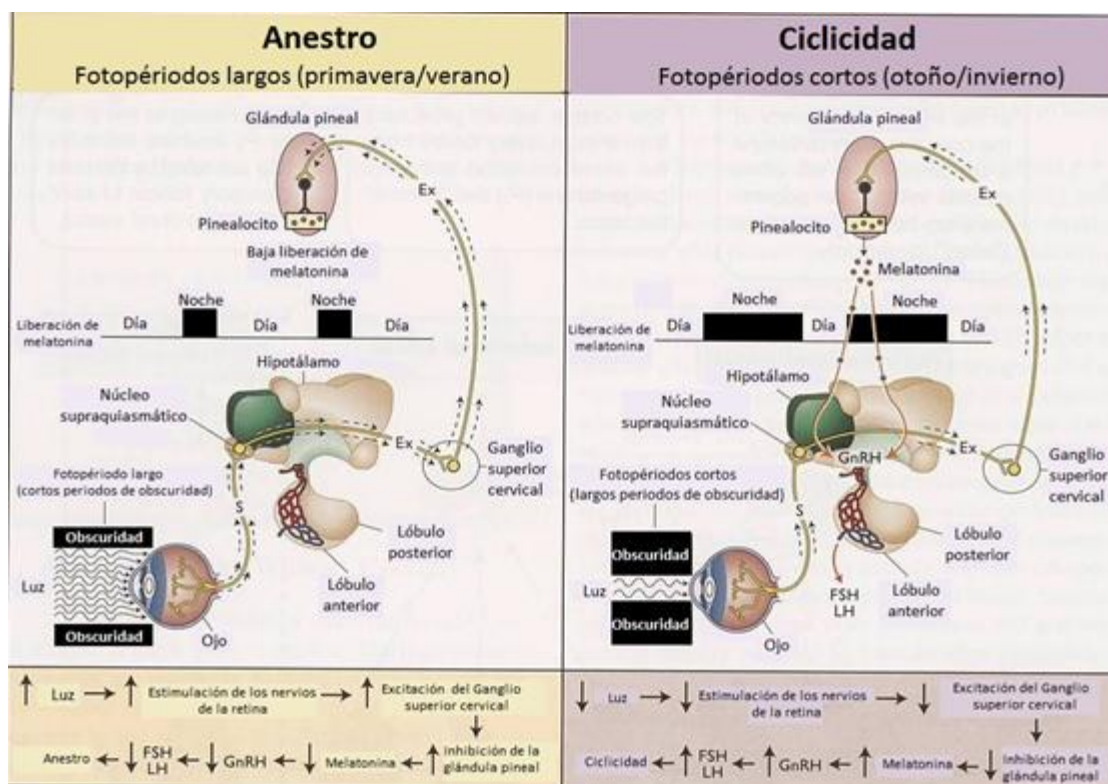


Figura 3. Estacionalidad reproductiva en reproductores de días largos y días cortos (Tomado de Calderón-Leyva, 2017).

En las razas estacionales, ejemplo, en el macho cabrío Alpino de enero a mayo, los niveles basales de testosterona son de 0.3 ng/ml en plasma, la frecuencia de los pulsos es alrededor de 1 en 8 horas, la amplitud de éstos son menores de 0.2 ng/ml y, como consecuencia, la concentración media de LH (0.4 ng/ml de plasma), es baja (Zarazaga *et al.*, 2012).

3.1.3. Regulación de la reproducción estacional por Kisspeptina

Muchas especies de animales domésticos tienen estaciones claras de actividad reproductiva con ciclicidad poliestrica y producción de espermatozoides junto con períodos de inactividad reproductiva. La comprensión de los sistemas que controlan esta reproducción estacional es esencial para gestionar la reproducción y la productividad de estas especies y dado el pronunciado papel estimulante de la kisspeptina en la pubertad y del estado reproductivo del adulto, este péptido representaba un atractivo sistema candidato responsable de controlar los cambios estacionales en la reproducción (Kriegsfeld *et al.*, 2015). Las kisspeptinas están reguladas por estación/ fotoperíodo fue discutida por primera vez cuando se observó que el número de células que contienen ARNm de KISS1 fue mayor en el núcleo arqueado en las ovejas durante la temporada de reproducción que durante la temporada de no reproducción. Un estudio posterior encontró una diferencia similar en el número de células kisspeptina en el núcleo arqueado medio y caudal en la cabra y en la yegua, a pesar de que la yegua es reproductora de día largo, mientras que las ovejas y las cabras son reproductoras de día corto (Scott *et al.*, 2019). La literatura ha demostrado la participación de estos péptidos en los aspectos de la maduración y la función del eje reproductivo. La reproducción debe ser un "buen diálogo" entre el cerebro, la hipófisis y las gónadas (Clarke y Caraty, 2013). Los genes de kisspeptina se expresan en una amplia gama de tejidos. En el cerebro de ovejas, las kisspeptinas se localizan en el arco y el área preóptica (POA) (Kitahashi y Parhar, 2013). En la mayoría de las especies, es mediada principalmente por una acción estimulante de GnRH (Clarke y Caraty, 2013; Kriegsfeld *et al.*, 2015).

Los aspectos en la regulación génica de la kisspeptina, los cuales estimulan la liberación de la GnRH, además, en la mayoría de las especies de vertebrados es evidente la existencia de múltiples kisspeptinas, por lo tanto, es importante aclarar los mecanismos para su regulación para entender las funciones de sus múltiples formas en el cerebro. Estos aspectos se centran en los aspectos comparativos de kisspeptina y su regulación de genes, que incluyen a los

esteroides gonadales, el fotoperíodo y las señales metabólicas (Kitahashi y Parhar, 2013; Kriegsfeld *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2019).

Las especies domésticas tienen una estacionalidad por función reproductiva por cambios en la secreción de GnRH. En particular, la kisspeptina, al transducir el efecto de retroalimentación de los esteroides gonadales (Clarke y Caraty, 2013).

Se conoce que las hormonas como el estradiol (E2) y la testosterona (T4), son los principales reguladores de los genes kisspeptina (Kitahashi y Parhar, 2013). Aunque la melatonina tiene un papel importante en la transducción de fotoperíodo con el sistema reproductivo, las células de kisspeptina no parecen expresar el receptor de la melatonina, por lo que los medios por los cuales la estacionalidad cambia el nivel de la actividad kisspeptina sigue siendo desconocido (Clarke y Caraty, 2013). Algunos estudios plantean que la kisspeptina es parte del mecanismo de regulación ambiental de la reproducción (Kitahashi y Parhar, 2013).

3.1.4. Aspectos nutricionales y su relación con la reproducción estacional

La nutrición y el efecto de la condición corporal (CC) y el peso vivo (PV) pueden influir en la actividad reproductiva en diferentes razas de cabras.

Se ha reportado que la influencia de la estacionalidad puede modificarse por el entorno nutricional. Existe evidencia de que en el ganado criollo mexicano que se mantiene en las latitudes tropicales la duración del período de anovulación se modula parcialmente por el estado de energía nutricional. En el área mediterránea, la mayoría de las cabras se manejan en sistemas extensivos o semiextensivos, y la producción está sujeta a variaciones estacionales en la disponibilidad de alimentos. La eficiencia reproductiva se correlaciona con los cambios en el peso corporal (Gallego-Calvo *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha demostrado que restringir el 25% de requerimientos nutricionales afecta la reproducción de la cabras durante el periodo de transición, pero no durante la época reproductiva (Rosales-Nieto *et al.*, 2006).

De manera general se concluyó que la secreción de GnRH se reduce en animales desnutridos. Sin embargo, se investigaron mediadores endocrinos entre el estado nutricional y los procesos reproductivos; entre ellos, el factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-I), la hormona del crecimiento, la colesistoquinina, el neuropéptido Y (NPY), los péptidos opioides endógenos y su relación con la insulina (Arroyo, 2011).

El hígado es el sitio del catabolismo de muchas hormonas lo cual al cambiar la dieta lo afecta directamente, mientras que un elevado plano de la nutrición podría resultar en una disminución en las concentraciones circulantes de testosterona que podrían alterar la secreción de gonadotropinas y por lo tanto, la actividad testicular en el eje (Martin *et al.*, 1992).

En carneros Merino, la inmunización activa contra la inyección de GnRH resultó en la regresión testicular (Hötzel *et al.*, 1992), lo que sugiere que el efecto de la nutrición en el crecimiento testicular es parcialmente independiente de los cambios en la secreción de gonadotropina (Martin *et al.*, 1992).

Los cambios bruscos en la nutrición tienen efectos marcados en el desarrollo testicular de los caprinos, como en el peso vivo (Walkden-Brown *et al.*, 1994).

Los machos salvajes tienen una marcada respuesta testicular a los cambios nutricionales, con incrementos testiculares de hasta el 50% la respuesta testicular es asociada muy estrechamente con aumentos en el peso vivo (Martin y Banchemo, 1999).

En la latitud subtropical, el fotoperíodo es de 1336 h de luz en el solsticio de verano a 1024 h de luz en el solsticio de invierno. Esta área tiene un clima seco con una temperatura media anual de 21 °C, que varía de 37 °C entre mayo y agosto, a 6 °C en diciembre y enero. La precipitación anual promedio es de 266

mm (en un rango de 163 a 504 mm) y el período seco dura de noviembre a mayo. En México la población de cabras se distribuye en latitudes subtropicales y tropicales ($<23.5^{\circ}$ N). La región de la Comarca Lagunera es una importante área de producción de caprinos. Las cabras locales se derivan de las razas española Granadina, Murciana y Malagueña. Estos animales fueron cruzados con razas, Anglo-Nubia, Alpina, Saanen y Toggenburg durante los últimos 70 años para mejorar la producción de leche y carne. Las hembras generalmente se mantienen con los machos en condiciones naturales de pastoreo, comiendo solo vegetación natural disponible sin alimentación suplementaria en el corral. De junio a enero, la disponibilidad de alimentos (%) y el contenido de nutrientes de las dietas seleccionadas por las cabras disminuyen (Junio: 9.1% CP; 1.7 Mcal / kg; enero: 7.4% CP; 0.9 Mcal / kg; figura 4)

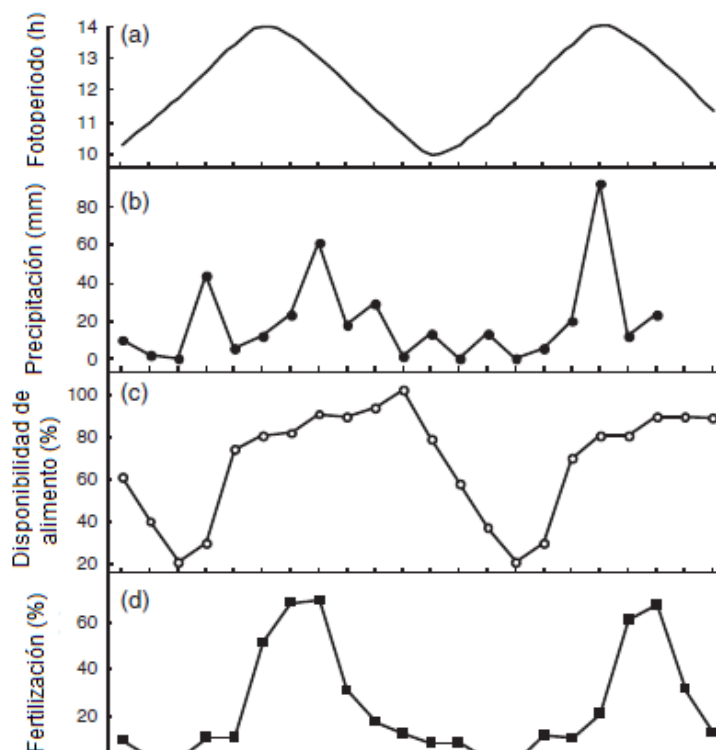


Figura 4. Cambios anuales en el fotoperiodo (a), lluvia (b), disponibilidad de alimento (c) y fertilización (d) de cabras locales del subtrópico de México mantenidas en contacto con machos en condiciones naturales de pastoreo (Adaptado de Delgadillo, 2010).

Para evaluar si la desnutrición causa la disminución estacional de la actividad sexual durante la temporada no reproductiva en machos cabríos, se determinó el peso testicular, la secreción de testosterona y la producción de esperma en machos cabríos alimentados con alfalfa *ad libitum* y 200 g de un concentrado comercial cuando se mantienen en corrales abiertos, sombreados, bajo fotoperiodo y cambios de temperatura naturales. En estos machos, el peso testicular, las concentraciones plasmáticas de testosterona y el semen cuantitativo y cualitativo variaron estacionalmente y fueron más altos durante la temporada de reproducción, que dura desde finales de primavera (mayo a junio) hasta finales de otoño (diciembre a enero), que durante la temporada no reproductiva (Figura 5) (Delgadillo, 2010).

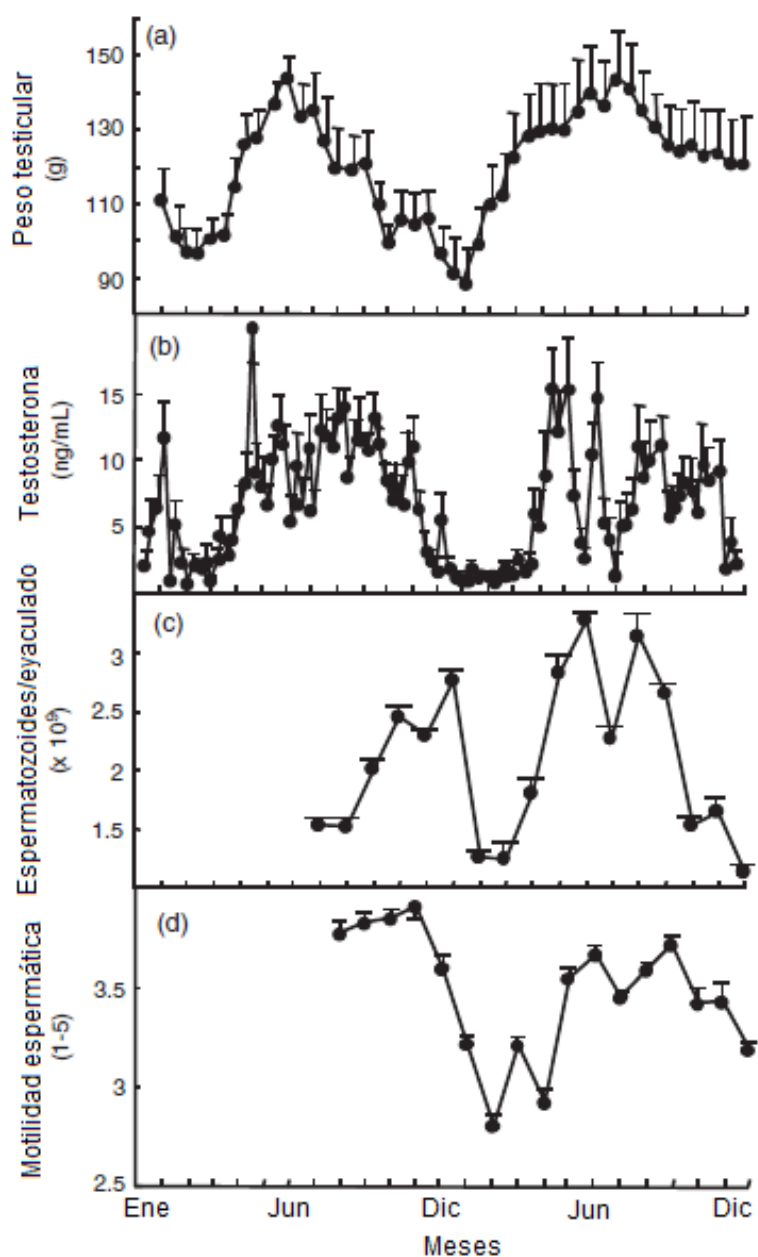


Figura 5. Variaciones estacionales en el peso testicular (a), concentraciones plasmáticas de testosterona (b), número total de espermatozoides por eyaculado (c) y motilidad progresiva de los espermatozoides (d) en machos cabríos locales bien alimentados y confinados en el subtrópico de México mantenidos en un corral abierto y sometidas a cambios fotoperiódicos y de temperatura naturales (Adaptado de Delgadillo, 2010).

3.2. Mecanismos neuroendocrinos de la reproducción

Los animales han evolucionado diversas variaciones estacionales en fisiológicas y reproductivas para adaptar los cambios anuales en las condiciones ambientales y climáticas. La pars tuberalis (PT) de la hipófisis, que comprende el lóbulo anterior del tallo pituitario que conecta el hipotálamo y la hipófisis, se ha identificado como un sitio clave involucrado en la regulación de la estacionalidad entre aves y mamíferos. Un paso clave en la comprensión del papel de la melatonina en el mamífero como respuesta fotoperiódica fue la identificación de receptores de melatonina en la PT (Helferd *et al.*, 2019).

La reproducción exitosa requiere de la activación de vías neuronales y hormonales para sincronizar la ovulación con la actividad locomotora máxima y el estado de excitación. Las hembras mamíferas muestran ritmos de diferentes escalas de tiempo que van desde minutos (liberación GnRH pulsátil) a horas/días (aumento de LH), días/semanas (ciclo ovárico) o incluso meses (reproducción estacional). Es importante aquí reiterar la definición de pulso generador como: un grupo de células organizadas que generan períodos intermitentes de actividad síncrona suficiente para generar un pulso de GnRH (Hebirson *et al.*, 2018).

La importancia de la secreción pulsátil de GnRH y LH para la fertilidad normal está bien establecida. Los diferentes patrones de liberación pulsátil de la GnRH a través del ciclo ovárico regulan diferencialmente la biosíntesis y secreción de la gonadotropina pituitaria (Thompson y Kaiser, 2015)

La generación de la oleada de LH requiere de altos niveles de circulación de estradiol (E^2), indicativo de maduración del folículo, así como una señal diaria, para asegurar que la ovulación se produzca en el momento adecuado para optimizar el éxito de la reproducción. En las hembras adultas hay dos señales importantes al tiempo de la ovulación: el nivel circulante de las hormonas gonadales, específicamente el estradiol, que es un indicador de maduración de los ovocitos, y la hora del día en que surgen los relojes biológicos. Esta doble

regulación garantiza que el momento de la ovulación coincida con el período de máxima actividad y motivación sexual (Simonneaux y Bahougne, 2015).

3.2.1. Eje hipotálamo-Hipófisis-Gonadal

La actividad reproductiva de las cabras lecheras está controlada por diversos factores tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre ellos, el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal desempeña un papel importante en la regulación con el hipotálamo modulando la secreción de gonadotropinas hipofisarias o factores inhibitorios. La gonadotropina actúa sobre la gónada a través de la circulación sanguínea periférica, la gonadotropina puede controlar el desarrollo y el proceso reproductivo del individuo al afectar las glándulas exocrinas y endocrinas (Nagamalleswari *et al.*, 2004). La mayoría de las cabras lecheras son mamíferos de uno o dos fetos, con 1 a 3 folículos maduros por ciclo estral, mientras que otros folículos de las cabras se inhiben en atresia y apoptosis. La selección de los folículos dominantes depende básicamente de dos aspectos: nivel de gonadotropina en la sangre y la expresión de los receptores hormonales en los folículos (Graff *et al.*, 2000). La FSH es importante, estimula el desarrollo de los folículos y el reclutamiento de óvulos inmaduros. La LH controla el desarrollo, la selección y la ovulación del folículo dominante, y también induce la apoptosis de otros folículos pequeños. En condiciones fisiológicas, cuando la FSH se eleva hasta un umbral, los folículos de 2 a 5 mm de diámetro pueden ser reclutados periódicamente, el tiempo de duración del reclutamiento del folículo determina el número de folículos reclutados (Leyvaocariz *et al.*, 1995).

Durante el proceso de selección de folículos dominantes de los animales, debido a la diferente sensibilidad de los folículos a la elevación de la concentración de gonadotropina, se seleccionan varios folículos sensibles del grupo de folículos. A través del efecto de la FSH, estos folículos sensibles aumentan el número de células granulosas y líquido folicular, lo que resulta en el crecimiento de los folículos. El reclutamiento, el desarrollo, la selección y la ovulación de los folículos son los factores principales que afectan la fertilidad de las cabras (Leboeuf *et al.*,

2008). En el proceso de desarrollo folicular, el reclutamiento de folículos primordiales, el desarrollo de folículos preantrales, la selección de folículos antrales, la maduración y ovulación de folículos dominantes son factores clave que determinan el número y la calidad de los óvulos; estos factores juegan un papel clave en la determinación de la tasa de preñez y el tamaño de la camada en cabras. Un estudio en Israel indicó que un alto nivel de producción de leche tiene efecto adverso significativo en el rendimiento reproductivo (Gootwine y Pollott, 2000). La heredabilidad del tamaño de la camada fue muy baja (~ 0.05), y la correlación genética con la producción de leche también fue baja (0.0 a 0.2) (Hamann *et al.*, 2004).

Las cabras lecheras como reproductoras estacionales tienen naturalmente un período de anestro durante la primavera en el hemisferio norte, y los machos también muestran grandes cambios en la actividad sexual. La temporada de reproducción de los machos cabríos comienza a principios del otoño y termina a fines del invierno. El comportamiento sexual, el tamaño testicular, la actividad espermatogénica, y la producción de esperma cuantitativa y cualitativa de los machos cabríos disminuyen dramáticamente cuando no hay estacionalidad reproductiva (Leboeuf *et al.*, 2008).

La evaluación de las funciones reproductivas de los machos cabríos de razas lecheras se realiza generalmente entre los 7 y 9 meses de edad en un corral individual por 15 colecciones de semen durante el comienzo de la temporada de cría, de los machos cabríos jóvenes se recolecta dos veces por semana, mientras que en los machos cabríos maduros se pueden recolectar de 3 a 5 veces por semana (Leboeuf *et al.*, 1995). Para tener más producción de cabritos, los productores generalmente prefieren inseminar utilizando protocolos de tratamiento hormonal, aunque tales prácticas de tratamiento hormonal están restringidas en Europa (Martin *et al.*, 2004). Alternativamente, el efecto macho puede ser una forma eficiente de inducir celos en un programa de IA. La inseminación podría realizarse una o dos veces durante un período de 24 h después de que se detecte el celo, como mediante la introducción de un macho

cabrío o por la introducción del macho cabrío celador (Leboeuf *et al.*, 2008). En medio del anestro estacional, se obtuvo un alto nivel de fertilidad (71% a 78% de la IA) utilizando semen congelado en cabras sometidas a tratamiento con largos días artificiales y progestágeno, seguido de IA 52 h después de la introducción del macho cabrío equipado con un mandil (Pellicer-Rubio *et al.*, 2008).

La reproducción estacional de los machos cabríos inhibe la recolección de semen durante 6 meses cada año, lo que limita el número total de dosis de semen producidas por macho durante su vida. Los ciclos fotoperiódicos artificiales, ampliamente utilizados en la industria avícola introducida por primera vez para carneros, permiten el control de la actividad sexual de las razas estacionales. La variación de 1 a 2 meses de días largos (16 h de luz: 8 h de oscuridad) seguido de 1 a 2 meses de días cortos (8 h de luz: 16 h de oscuridad), disminuye la variación estacional en la actividad sexual de los machos cabríos (Delgadillo *et al.*, 1999; Leboeuf *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1998).

Se informó que los machos cabríos bajo tratamientos fotoperiódicos durante 3 años consecutivos y con recolecta seminal dos veces por semana dieron una tasa de fertilidad idéntica y un mayor número de espermatozoides totales que los machos cabríos de prueba, con recolecta seminal dos veces por semana durante la temporada reproductiva. En otro ensayo con un régimen de recolección más intensivo de 4 veces/semana durante el año, los machos cabríos que tuvieron un tratamiento de 2 meses de días largos seguidos de 2 meses de días cortos produjeron más dosis de semen que los machos cabríos mantenidos bajo el mismo ritmo de recolección y con luz natural de septiembre a febrero (Leboeuf *et al.*, 1998; Leboeuf *et al.*, 2004; Pellicer-Rubio *et al.*, 2007).

El conocimiento de los diferentes efectos del fotoperíodo en las vías neuroendocrinas y la actividad reproductiva en las cabras ha permitido a los productores aplicar con éxito tratamientos con luz/melatonina para controlar la actividad reproductiva estacional en condiciones de campo y también en machos cabríos criados en centros de IA (Chemineau *et al.*, 1992; Abecia *et al.*, 2012; Zaja *et al.*, 2018). Los machos cabríos tratados con fotoperíodo tienen la misma

capacidad que los machos cabríos tratados con melatonina para inducir una respuesta en la reproducción de las cabras durante la primavera (Zarazaga *et al.*, 2019). Actualmente, este esquema fotoperiódico se utiliza en Francia y otros países europeos en estaciones de ganado como parte del programa de cría de cabras. El semen congelado es sin duda beneficioso para los programas de reproducción. El semen de un macho cabrío superior se puede crioconservar para la mejora genética después de las pruebas de progenie. Además, el semen fresco que es menos costoso que el semen congelado podría usarse para el manejo reproductivo, lo cual es una práctica común en los países en desarrollo (Barrell *et al.*, 1992).

La Actividad neuroendocrina se sabe desde hace mucho tiempo que los días largos inhiben mientras que los días cortos estimulan la actividad sexual en los reproductores de días cortos, como ovejas y cabras. Sin embargo, estos efectos específicos de la duración del día no son permanentes, y cuando son sometidos a un fotoperíodo constante, los animales se vuelven 'refractarios', escapan del fotoperíodo prevaleciente: los días largos ya no son inhibitorios y los días cortos ya no son estimulantes. En cabras y ovejas, esta refractariedad podría conceptualmente ser considerado simplemente como el primer paso de la expresión de los ritmos endógenos circanuales. Puede ser superado transfiriendo animales al fotoperíodo opuesto: refractariedad a los días cortos, que ocurre naturalmente en las ovejas a fines del invierno, se rompe por 2 meses de exposición a días largos en diciembre-enero, permitiendo restablecer la eficiencia de los días cortos estimuladores (Jackson *et al.*, 1988). Por lo tanto, controlar la estacionalidad de la reproducción es posible sometiendo a los animales a fotoperíodos opuestos. Esta propiedad ahora se usa comúnmente en tratamientos fotoperiódicos aplicados en granjas o en centros de IA (Chemineau *et al.*, 2007). La definición de lo que realmente es días largos y días cortos no es sencillo: es posible definir un umbral de fotosensibilidad basada en el número de horas de luz por día, bajo el cual días largos son estimulantes y bajo del cual días cortos son inhibitorios. Ahora se acepta comúnmente que días largos son días

más largos que los anteriores, y que los días cortos son días más cortos que los anteriores.

La temporada de reproducción para una raza dada puede ser muy estable de un año a otro, con fechas fijas de inicio y fin de actividad de la ovulación y un período de máxima calidad y producción de esperma. Este momento preciso es mecanismo complejo que permite a los animales 'localizar' su temporada de reproducción durante el año y expresar su actividad sexual en el momento adecuado, sincrónicamente con factores ambientales externos y entre sexos. En estos mamíferos estacionales, de manera similar al reloj circadiano (es decir, con un período de ejecución libre cercano a las 24 h que genera ritmos circadianos endógenos), al ritmo endógeno circanual es probable que los animales generen períodos alternos de descanso sexual con períodos de actividad sexual durante todo el año. Estos períodos alternos pueden ser observados experimentalmente durante al menos dos años consecutivos, cuando los animales se mantienen bajo constantes regímenes artificiales fotoperiódicos (días cortos constantes). Las ovejas y los hámsters son dos modelos experimentales que han contribuido a una mejor comprensión de los ritmos endógenos y de refractariedad, mecanismos esenciales que rigen la reproducción estacional (Larkin *et al.*, 2002; Lehman *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2008) o la muda del pelaje (Paul *et al.*, 2008). En las ovejas, este ritmo endógeno se cronometra por señales discretas dadas por cambios externos en el fotoperíodo (Barrell *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos subyacentes a este sistema circanual permanecen en gran medida desconocidos. La entrada fotoperiódica se percibe en mamíferos exclusivamente a través de los ojos, luego es transmitida a través de una vía multisináptica a la glándula pineal, que transduce la señal fótica en una sustancia química. Se piensa que la melatonina es entregada a los tejidos periféricos por la circulación sistémica y al cerebro a través del líquido cefalorraquídeo (Thiery *et al.*, 2009).

Se ha demostrado recientemente que la tasa de rotación de LCR en ovejas cambia de acuerdo con ciclo claro-oscuro; se incrementa durante los días cortos

y se reduce en días largos, por lo tanto este fenómeno podría explicar las diferencias en las concentraciones hormonales en CSF, y podría afectar en cierta medida a los mensajes melatonérgicos de los sitios receptivos dentro del cerebro. Para controlar la actividad reproductiva, y especialmente la actividad pulsátil de GnRH en ovejas, la melatonina actúa sobre el área premamilar del hipotálamo (PMH). Se demostró claramente que implantes de melatonina insertados dentro del PMH desencadenaron actividad GnRH-LH, mientras que los implantes de melatonina que se insertan dentro de la pars tuberalis de la pituitaria no modifican la secreción de LH (aunque una fuerte densidad de receptores de melatonina se expresan en ovejas como en la mayoría de mamíferos) (Malpaux *et al.*, 1998). La melatonina se puede detectar en las transcripciones del receptor MT1, y los receptores de membrana se expresan en ovejas ILe-de-France mediada por el PMH. Aproximadamente 45 días después del inicio del día impregnación de melatonina estos es probable que los receptores participen en la estimulación de la actividad pulsátil de GnRH que, a su vez, conducirá a actividades sexuales gonadales y conductuales (Migaud *et al.*, 2005).

En ovejas la actividad dopaminérgica inhibe la pulsatilidad de GnRH. Más recientemente, el papel estimulante de kisspeptina y su receptor GPR54 se mostró en la temporada y control del fotoperiodo y la pulsatilidad GnRH/LH, sugiriendo que esta pareja juega un papel clave para la estimulación de la pulsatilidad y que las neuronas de kisspeptina, ellas mismas están sujetas a estacionalidad y control del fotoperíodo (Wakabayashi *et al.*, 2010).

La variabilidad entre razas tiene grados variables, por ejemplo, ovejas merinas y manchegas (Santiago-Moreno *et al.*, 2000) así como las ovejas Chios (Avdi *et al.*, 1993), presentan una expresión moderada de estacionalidad, mientras que las ovejas Soay y Texel son altamente estacionales (Hafez, 1952). En los trópicos, las razas locales generalmente presentan una muy baja estacionalidad o ciclo todo el año sin período anovulatorio. Los productores de los trópicos están interesados por esta baja estacionalidad, ya que pueden organizar la temporada de cría de su rebaño durante todo el año, sin tratamientos hormonales caros. Por

desgracia cuando son sometidos a las grandes variaciones fotoperiódicas y climas templados de los países del norte, una marcada estacionalidad se expresa en estas razas (Chemineau *et al.*, 2004). Esto impide su posible práctica de uso en bandadas bajo latitud templada y también perjudica su uso experimental para explorar los mecanismos involucrados en el control genético de la estacionalidad de la cría y actividad bajo latitudes templadas.

La variabilidad entre razas también existe en razas templadas mantenidas bajo condiciones ambientales similares de donde se originan. Algunos rasgos reproductivos incluyendo el inicio, el final y la duración de la temporada de reproducción se encontraron repetibles y heredables, y son por lo tanto, rasgos candidatos para la selección genética. La fertilidad fuera de la temporada también demostró ser un rasgo que puede usarse para una selección divergente exitosa. Para evitar efectos nocivos de seleccionar experimentalmente contra fertilidad, rasgos indirectos como la presencia de actividad ovulatoria espontánea en principios de la primavera, lo que probablemente indica una temporada de reproducción más prolongada y está vinculada a la fertilidad potencial, se encontró que era heredable en ovejas Merinas y podría ser utilizado en la selección. En esta raza, la selección divergente en este rasgo es factible (Teyssier *et al.*, 2002). Tales líneas podrían ser utilizadas en el futuro para explorar con más detalle los mecanismos por los cuales las razas estacionales controlan su capacidad reproductiva anual y los genes involucrados para controlar esto (Sakamoto *et al.*, 2010).

Las neuronas de la GnRH en el prosencéfalo basal son la vía común final a través de la cual el cerebro regula la reproducción. La secreción de GnRH ocurre de manera pulsátil, y la evidencia indirecta sugiere que las neuronas de kisspeptina en el núcleo arqueado (ARC) sirven como el marcapasos central que impulsa la secreción pulsátil de GnRH. Los estudios genéticos en humanos han revelado que la kisspeptina y la neuroquinina B (NKB) están involucradas en el mecanismo de control central de la secreción de GnRH. Se ha demostrado que la

administración de kisspeptina o NKB (o sus análogos) aumenta la secreción de LH (Wakabayashi *et al* 2010; Oakley *et al.*, 2009).

Mientras que la administración de sus antagonistas suprime la secreción de LH (Ramaswamy *et al.*, 2010). Una población de neuronas en el núcleo arqueado (ARC) coexpresa estos 2 neuropéptidos en una variedad de mamíferos, incluidos los ratones, ratas, ovejas, cabras y monos. La evidencia emergente reciente sugiere que la población de neuronas de kisspeptina/NKB en el ARC es un candidato probable para la fuente intrínseca del generador de pulsos GnRH. Esta hipótesis está respaldada por los hallazgos de que el electrodo activo que detectó la descarga de la actividad de unidades múltiples (MUA), estaba ubicado muy cerca de las neuronas kisspeptina/NKB en la porción caudal del ARC en caprinos tanto en machos como en hembras. Por lo tanto, es razonable plantear la hipótesis de que la señal neural de la feromona masculina se transmite y procesa en neuronas de kisspeptina ARC/NKB para facilitar la actividad del pulso generador de GnRH (Sakamoto *et al.*, 2010).

3.2.2. Rol de las kisspeptinas en el proceso reproductivo

La Kisspeptina es un neuropéptido hipotalámico que es crítico para la fertilidad. En prácticamente todas las especies, las neuronas kisspeptina estimulan la secreción de la GnRH y actúan como transmisores para la retroalimentación de esteroides sexuales a las neuronas GnRH.

Las neuronas Kp se localizan dentro de dos áreas hipotalámicas, en el núcleo arqueado (ARC) y el núcleo periventricular rostral del tercer ventrículo, también llamado núcleo anteroventral periventricular (AVPV), o el área preótica (según la especie). El receptor Kp, Kiss1R (anteriormente GPR54), se expresa altamente en las neuronas de GnRH, pero también en otras áreas cerebrales (Herbison *et al.*, 2010; Simonneaux *et al.*, 2013), y en la mayoría de los tejidos endocrinos como la glándula, ovario y placenta (Kotani *et al.*, 2001); además se habla del reloj circadiano maestro ubicado en el núcleo supraquiasmático hipotalámico

(SCN) que se sincroniza con el ciclo diario principalmente a través del ciclo de luz/oscuridad y a una extensión menos por otras señales de tiempo (ingesta de alimentos y actividad de sueño/vigilia); los transmisores remiten la información diaria al eje reproductivo: la arginina vasopresina (AVP) es el transmisor diario más esencial que se proyecta a las neuronas kisspeptin (Kp) de los núcleos anteroventrales periventriculares (AVPV), que a su vez activan fuertemente las neuronas GnRH ubicadas en el área preóptica (POA); a lo largo del ciclo estral, el estradiol se retroalimenta en diferentes niveles del eje reproductivo principalmente a través del receptor de estrógeno (ER). Las neuronas Kp son los principales objetivos de estradiol con un efecto inhibitorio de bajo estradiol en las neuronas Kp del núcleo arqueado (ARC) y una acción estimulante de alto estradiol en las neuronas Kp AVPV. Además del reloj circanual maestro, los relojes periféricos se encuentran en las neuronas AVPV Kp, neuronas GnRH, gonadotrofos pituitarios, y los diferentes tipos de células del ovario (Simonneaux y Bahougne *et al.*, 2015)

Curiosamente, la retroalimentación de estradiol en roedores depende de la localización de la neurona Kp ya que el estradiol estimula la expresión Kiss1 en el AVPV e inhibe la expresión Kiss1 en el ARC (Smith *et al.*, 2005). En los mamíferos no roedores, se observa una diferencia similar por estradiol, también se observa con un efecto estimulante en el núcleo periventricular/POA rostral y un efecto inhibitorio en el ARC (Hoffman *et al.*, 2011). La mayoría de las funciones biológicas, incluida la reproducción de las hembras, son sincronizadas con la variación diaria de los factores ambientales. Entre estos factores, el ciclo de luz/oscuridad recurrente es el ambiental predecible utilizado por los mamíferos para ajustar su comportamiento y fisiología apropiadamente (Simonneaux y Bahougne *et al.*, 2015).

Aunque el AVP libera las neuronas SCN por la tarde (Kalsbeek *et al.*, 2010), el AVP puede activar las neuronas Kp por la mañana o por la tarde, indicando que el control diario de la oleada de LH no está cerrado por las Neuronas del AVPV Kp (Williams *et al.*, 2011).

Cada tipo de célula del ovario, incluyendo células lúteas, células de granulosa, y los ovocitos tienen un reloj circadiano (Sellix *et al.*, 2015). Otros análisis han reportado que los ritmos genéticos del reloj sólo se observan en la granulosa madura y células lúteas, lo que indica que estos ritmos se activan en una etapa específica del desarrollo del folículo, posiblemente bajo el control de FSH actuando como un sincronizador de las actividades de células foliculares (Chen *et al.*, 2013)

3.3. El betacaroteno

Los carotenoides son pigmentos que están presentes en todos los organismos fotosintéticos y no fotosintéticos así como en bacterias, algas, hongos, insectos y animales y son responsables de la mayoría de los colores rojo a amarillo de muchas hojas, frutas, flores y peces. Los colores característicos de muchas aves, insectos e invertebrados marinos, se han originado en la dieta debido a la presencia de carotenoides (Fraser y Bramley, 2004; Nozière *et al.*, 2006; Young y Lowe, 2018).

La principal función biológica es de servir como pigmentos en los procesos de fotosíntesis, y como sustancia fotoprotectora. Además, actúa inhibiendo la propagación de ROS y otros radicales libres (Fraser y Bramley, 2004; Nozière *et al.*, 2006).

Estos pigmentos orgánicos sintetizados a partir de unidades de isopreno en plantas y algas, representan uno de los grupos más extendidos de pigmentos naturales. Existen 1117 carotenoides conocidos y caracterizados estructuralmente (Yabuzaki, 2017). Las plantas los sintetizan de novo, pero están presentes en los animales, donde se acumulan sin cambios de la dieta o modificados metabólicamente. Los carotenoides vegetales son la fuente dietética primaria de provitaminas A, con el betacaroteno como el ejemplo más conocido. El requisito estructural esencial en la molécula de vitamina A unido a una estructura de polieno conjugada intacta, por lo que el betacaroteno con dos unidades estructurales esenciales es la provitamina A más potente. El sitio

principal de la conversión de betacaroteno a vitamina A es la mucosa intestinal y dos enzimas están involucrados: la oxigenasa que divide la molécula en el centro para producir la retina (aldehído de vitamina A) y la reductasa retiniana que convierte la retina en retinol (Goodman *et al.*, 1965). El retinol y los metabolitos como el ácido retinoico son importantes en la visión, las funciones inmunes y cerebrales la remodelación de tejidos y el metabolismo (Brossaud *et al.*, 2017).

3.3.1. Estructura y propiedades químicas de los carotenoides

Los carotenoides son moléculas lipofílicas clasificadas por estructura como carotenos y xantofilas. Ambas clases comparten una estructura común poliisoprenoide C40 que contiene una serie de enlaces dobles conjugados ubicados centralmente (Fratianne *et al.*, 2010). Algunos carotenoides son moléculas de polieno de cadena abierta, mientras que otros tienen grupos extremos cerrados, como un anillo de β -ionona. Los carotenos (por ejemplo, β -caroteno, α -caroteno y licopeno) son hidrocarburos no polares. Las xantofilas más polares (por ejemplo, luteína, zeaxantina, canthaxantina y β -criptoxantina) contienen oxígeno como un grupo hidroxilo o ceto contenido en el grupo final (Deming y Erdman, 1999).

Las funciones de una molécula de carotenoide dependen principalmente de su estructura química, se considera el factor más importante en las reacciones de transferencia de energía, que es absorber la luz durante la fotosíntesis y proteger las células de la fotosensibilización (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Young y Lowe, 2001).

La estructura no solo determina la absorción de luz y color de las moléculas de carotenoides, sino que también puede proporcionar información sobre su absorción, metabolismo y efectos biológicos complejos, que pueden ser relevantes para procesos *in vivo* en especies de mamíferos, esta característica de la molécula también permite la extinción de $^1\text{O}_2$ (Young y Lowe, 2001).

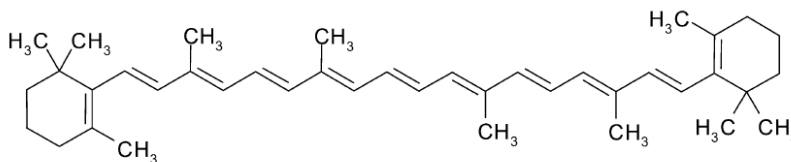
El anillo de β -ionona de seis miembros de β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina proporciona a estos principales carotenoides dietéticos la capacidad

de ser metabolizados a vitamina A. La presencia de un anillo de seis miembros ubicado en el extremo de la estructura polieno se ha asociado con la estimulación de la comunicación de uniones gap intercelular (Sies, 1997). De los carotenoides de provitamina A, se ha demostrado que el betacaroteno induce las proteínas de las uniones gap, las conexinas (Deming y Erdman, 1999).

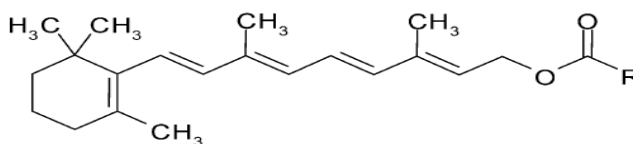
Las uniones gap son canales de membrana que permiten la transferencia de iones y moléculas pequeñas entre células contiguas (Huang *et al.*, 1998). Las conexinas (Cxs) son las proteínas que forman los canales y la comunicación intercelular de uniones gap (GJIC) juega un papel clave en la comunicación celular y la homeostasis en organismos multicelulares. GJIC puede disminuir progresivamente durante la carcinogénesis de etapas múltiples y la prevención de la baja regulación de GJIC en las células cancerosas sin comunicación podría ser un enfoque quimiopreventivo y quimioterapéutico efectivo (Trosko, 2003).

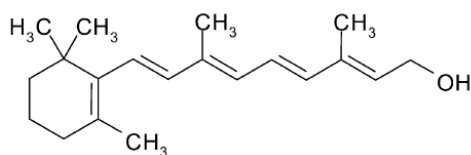
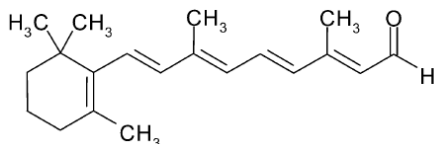
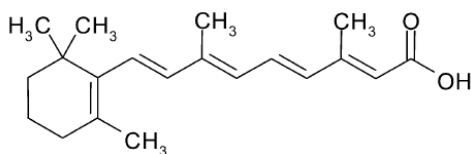
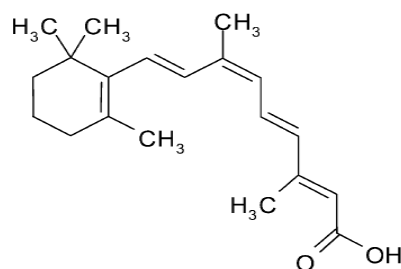
Zhang *et al.* (1992), encontraron que los carotenoides inducen GJIC a través de una mayor expresión de conexina 43 (Cx43) en la línea celular de fibroblastos de embrión de ratón. Cx43 es un componente del canal de unión GAP en muchos tipos de células, incluidas las células pulmonares humanas (Cesen-Cummings., *et al* 1998). La actividad de estimulación está asociada con las propiedades estructurales de los carotenoides (Sies, 1997; Stahl y Sies, 2005).

Beta caroteno



Ésteres de retinol



Retinol**Retinal****-trans ácido
retinol****9-cis-ácido
retinoico****Figura 6.** Fórmulas estructurales del betacaroteno y sus metabolitos

3.3.2. Contenido de betacaroteno en forrajes

El contenido de carotenoides en los forrajes depende de su síntesis y degradación en la planta, la síntesis se da a partir de la formación de isopreno y ocurre en muchos niveles de la planta (Armstrong y Hearst, 1996; Gandul y Mínguez, 1996). El betacaroteno (BC) es importante, sin embargo el contenido de betacaroteno en los forrajes es variable (Latscha, 1990). Además existen

otros factores que intervienen en la concentración de carotenoides, de acuerdo a la especie, los niveles de carotenos varían de 5-10 veces (Livingston *et al.*, 1968).

En la mayoría de los casos, incluso si la concentración de b-caroteno y a-tocoferol en el forraje es alta, los requerimientos de vitaminas A y E de los rumiantes no pueden ser cubiertos adecuadamente por su consumo diario de forraje (McDowell, 2002). Por lo tanto, varios factores pueden modificar el suministro nutricional de vitaminas A y E del forraje. El nivel de conversión de b-caroteno varía (1 mg de betacaroteno = 400 UI de vitamina A en una vaca lechera lactante) según el estado de salud y la cantidad consumida. La tasa de conversión se reduce a medida que aumenta el nivel consumido, y generalmente se acepta que este factor de conversión para rumiantes solo es válido en los niveles de ingesta correspondientes al mantenimiento (Bondi y Sklan, 1984).

Entre otros factores que intervienen en la variación del contenido de BC está la estación del año, como la alfalfa que tiene mayor concentración en marzo/abril (349 mg kg⁻¹) vs mes julio (251 mg kg⁻¹) (Williams y Morgan 1998). De igual forma, el contenido de BC varía según la edad de la planta, al encontrar mayor concentración de BC en el raygrass inmaduro vs maduro y la fertilización con N incrementa la concentración de caroteno en especies cultivadas; podría deberse a la actividad de los carotenos en la biosíntesis de proteínas (Park *et al.*, 1983).

3.3.2.1. Efecto de los procesos de preservación de forrajes cultivados sobre las concentraciones de carotenoides

En forrajes secos expuestos al sol, decrece fuertemente la concentración de carotenoides, especialmente cuando éstos son humedecidos por la lluvia durante el henificado. Las diferencias entre especies sobre el contenido de carotenos, son menos importantes que las diferencias del contenido de carotenos cuando éstas se someten a un proceso de secado. La degradación ocurre rápidamente por oxidación, principalmente por alta exposición a la radiación solar (Chauveau-Duriot *et al.*, 2010), ellos observaron en promedio una pérdida de 83% de carotenoides entre el corte directo y el henificado. Esta pérdida de carotenoides es principalmente por la radiación solar, debido a la exposición a los rayos UV,

que son capaces de destruir todos los carotenos (Cardinault y Noziere, 2004). Sin embargo, ocurren pérdidas moderadas de carotenoides durante el almacenamiento del heno (Bruhn y Oliver, 1978), debido probablemente a la presencia de oxígeno.

El principal factor responsable de la variación en los niveles de betacaroteno es la proporción de hoja a tallo. La formación de tallos se acompaña de un aumento en la concentración de MS. Por lo tanto, existe una correlación negativa entre el contenido de MS y el nivel de betacaroteno (Ballet *et al.*, 2000).

El ensilado de maíz es bajo en carotenoides, independientemente del marchitamiento, el proceso de ensilado disminuye en varios niveles la concentración de carotenoides. La pérdida de carotenoides es dependiente del pH y favorecida por la condición aeróbica. La pérdida de carotenoides es superior en leguminosas que en pastos cuando el pH es bajo (pH=5) y cuando esto se adiciona al tiempo en el retraso al silo y aumenta el tiempo de almacenamiento en el silo, las pérdidas de carotenos incrementan. La máxima pérdida puede estar alrededor del 80% de la concentración inicial, pero cuando se hace el ensilado, las pérdidas en la concentración son generalmente del 20% (Ballet *et al.*, 2000).

La deshidratación de alfalfa resulta en una pérdida de caroteno y xantofilas y depende de la extensión del proceso, esta pérdida es elevada especialmente de xantofilas a causa de la alta temperatura del proceso y cuando el producto final contiene una elevada humedad. Cuando la temperatura es muy elevada (más de 150°C) y la humedad de 3%, puede resultar en una pérdida superior a 33% de caroteno y 73% de xantofilas (Burdick y Fletcher, 1985).

En general la pérdida de betacaroteno en los diferentes procesos de conservación de forrajes es evidente. Williams y Morgan (1998), determinaron los valores medios de betacaroteno en 196, 159, 81 y 36 mg kg⁻¹ MS para forrajes verdes, forrajes deshidratados, ensilados y henos, respectivamente.

3.3.3. Metabolismo Retinoide

El metabolismo retinoide, ocurre en la porción proximal del intestino delgado tanto en la luz como en el enterocito (Blomhoff *et al.*, 1991). Para una absorción óptima del retinoide, la grasa debe consumirse junto con el retinoide recién ingerido. Esto facilita la entrada de retinoides en los enterocitos desde la luz del intestino y permite la formación óptima de quilomicrones, ya que los retinoides, como otros lípidos de la dieta, ingresan al cuerpo como un componente de quilomicrones nacientes ricos en triglicéridos.

Los carotenoides proretinoides de la dieta, como el betacaroteno, así como los carotenoides no proretinoides como el licopeno y la luteína se liberan de la matriz alimentaria y se emulsifican con ácidos grasos y ácidos biliares para facilitar su absorción en los enterocitos e incorporarse en quilomicrones e ingresar a la circulación general y al cuerpo (Blomhoff *et al.*, 1991). En intestino los carotenoides proretinoides de la dieta se absorben intactos en el enterocito, donde se convierten a retinoides o se pueden empaquetar sin modificar en quilomicrones.

3.3.4. Conversión enzimática de carotenoides proretinoides en retinoides

Las enzimas involucradas en la conversión de carotenoides proretinoides en retinoides existen esas enzimas dentro de los tejidos de los mamíferos que pueden escindir el betacaroteno, ya sea simétricamente en su doble enlace central carbono-carbono 15,15', formando dos moléculas de retinaldehído, o asimétricamente en otros enlaces dobles carbono-carbono, formando dos productos de longitud de cadena desigual (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

El producto del gen *Bcmo1*, que codifica una enzima capaz de catalizar la escisión central del betacaroteno, media la formación de retinoides a partir de los carotenoides proretinoides en la dieta (Hessel *et al.*, 2007; Fiercea *et al.*, 2008) dos proteínas estructuralmente relacionadas, betacaroteno-15,15'-monooxigenasa (BCMO1), codificada por *Bcmo1*, y betacaroteno-9', 10'-

monooxigenasa (BCMO2), codificada por *Bcmo2*, son las únicas enzimas mamíferas conocidas para escindir los carotenoides. BCMO1 y BCMO2 son altamente homólogas entre sí y comparten 39% de identidad de secuencia con BCMO1 y BCMO2 de ratón. Cada una tiene un alto grado de homología de secuencia con la proteína retiniana RPE65, que cataliza la isomerización de todo el retinoide trans al isómero 11-cis para su uso en el ciclo visual. La BCMO1 es una proteína soluble, que contiene Fe^{2+} , de 63 kDa. Se expresa en el intestino delgado (a niveles más altos, mientras más proximales al estómago), hígado, riñón, pulmones, piel, testículos, el epitelio pigmentario de la retina dentro del ojo y en varios tejidos embrionarios (Paik *et al.*, 2001; Wyss, 2001; Paik *et al.*, 2004; Wyss, 2004).

Los genes *Bcmo1* y *Bcmo2* y su expresión: varios laboratorios han estudiado el gen para *Bcmo1* y la regulación de su expresión. Se ha demostrado que los genes de ratón y humano para *Bcmo1* contienen elementos de respuesta funcionales del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) [PPRE] (Boulanger *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2006).

3.3.5. Esterificación de retinol por enterocitos

El retinol dietético recientemente absorbido dentro del enterocito debe esterificarse antes de su envasado como éster de retinilo en quilomicrones nacientes. La literatura anterior había indicado que el intestino posee dos actividades enzimáticas distintas capaces de sintetizar ésteres de retinilo a partir de retinol (Blomhoff *et al.*, 1991). Uno de estos, la lecitina: retinol aciltransferasa (LRAT), cataliza la transesterificación del retinol empleando un grupo acilo graso presente en la posición A1 de una molécula de fosfatidilcolina de membrana. El otro, acil-CoA: retinol aciltransferasa (ARAT), cataliza la esterificación del retinol dependiente de acil-CoA graso. En resumen, LRAT representa la gran mayoría del éster de retinilo formado en el enterocito tras el consumo de niveles normales de retinoide en la dieta; DGAT1, un ARAT intestinal, representa la actividad de esterificación restante (Wongsiriroj *et al.*, 2008).

- **Proteína de unión a retinol celular, tipo II (CRBP II)**

Los retinoides son muy insolubles en agua y, en consecuencia, dentro del ambiente acuoso del cuerpo, generalmente se encuentran unidos a proteínas de unión a retinoides específicas. En el adulto CRBP II se expresa únicamente en la mucosa intestinal y facilita la absorción óptima de retinol de la dieta (Blomhoff *et al.*, 1991).

La CRBP II actúa para garantizar el suministro adecuado de retinol a un feto en desarrollo cuando el retinoide en la dieta es limitante. Investigaciones posteriores que hacen uso de ratones deficientes en CRBP II criados en el fondo deficiente en LRAT (que carecen de *Crbp II* y *Lrat*) establecieron que CRBP II canaliza metabólicamente retinol a LRAT para la síntesis de éster de retinilo (Wongsiriroj *et al.*, 2008).

3.3.6. Quilomicrones y su metabolismo en la circulación

Para la absorción del retinoide de la dieta, el éster de retinilo se envasa junto con otros lípidos en los quilomicrones nacientes, que se secretan en el sistema linfático (Blomhoff *et al.*, 1991). Así, el carotenoide dietético que no se ha convertido en retinoide también se incorpora a los quilomicrones. Después de ingresar a la circulación general, los quilomicrones se someten a un proceso de remodelación que implica principalmente la hidrólisis de triglicéridos por la lipoproteína lipasa (LpL) y la apolipoproteína E (apoE) de la circulación, lo que resulta en la formación de restos de quilomicrones. Durante mucho tiempo se ha establecido que el 66-75% del retinoide de la dieta (quilomacrón y retinoide remanente de quilomacrón) es absorbido por el hígado, donde se almacena en las células estrelladas hepáticas (HSC), y el resto es eliminado por los tejidos periféricos (Goodman *et al.*, 1965).

La lipoproteína lipasa (LpL) puede hidrolizar el éster de retinilo presente en los quilomicrones, y se ha propuesto que la hidrólisis del éster de retinilo facilita la absorción de retinol por los tejidos periféricos (Blaner *et al.*, 1994). La LpL facilita la absorción de retinoide posprandial en los tejidos y han establecido que LpL

actúa para modular la absorción de retinoides posprandial por el músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo (Blaner *et al.*, 1994; Van Bennekum y Kako, 1999), el tejido mamario y la leche (Ross *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2017), y probablemente pulmón (Ross y Li, 2007).

3.3.7. Metabolismo hepático retinoide

El hígado es el sitio principal del metabolismo retinoide y el almacenamiento en el cuerpo (Blomhoff *et al.*, 1991). Hay dos tipos de células hepáticas importantes para estos procesos: las células parenquimatosas (también conocidas como hepatocitos) y las células estrelladas (también conocidas como células de almacenamiento de grasa, adipocitos, células de Ito y/o células perisinusoidales). Los hepatocitos comprenden aproximadamente el 66% de las células en el hígado y contienen el 90% de la masa proteica total (Geerts, 2001; Friedman, 2008). Las células estrelladas hepáticas (HSC) son relativamente mucho más pequeñas y menos abundantes. Las HSC comprenden solo el 6-8% de las células en el hígado y contienen el 1% de la proteína hepática (Geerts, 2001; Friedman, 2008). Está bien establecido que los hepatocitos están involucrados centralmente en la absorción y el procesamiento de retinol en el hígado, y que las HSC desempeñan un papel central en el almacenamiento de retinoides hepáticos.

- **Captación y procesamiento de Chylomicron Retinyl Ester (éster de retinilo de quilomicrón) por el hepatocito**

Cuando el retinilo remanente que contiene éster de quilomicrones llega al hígado, pasa al espacio de Disse (ubicado entre el endotelio y el hepatocito) en un proceso denominado tamizado (Wisse *et al.*, 1985). Solo pueden pasar restos del tamaño apropiado, mientras que las partículas más grandes, incluidos los quilomicrones completos, están excluidas. Una vez dentro, el remanente es absorbido exclusivamente por los hepatocitos por una de las dos posibles vías mediadas por el receptor.

- **Hidrólisis del éster de retinilo en el hepatocito**

Al ingresar al hepatocito, el éster de retinilo se asocia con endosomas tempranos y se somete a una hidrólisis rápida (Harrison, 1995). La hidrólisis del éster retínico se lleva a cabo por enzimas las cuales son denominadas en la literatura como REH, carboxilesterasas y / o lipasas.

- **Transferencia de retinol de hepatocitos a las células estrelladas hepáticas (HSC).**

Después de que el éster de retinilo de quilomicrón se hidroliza a retinol dentro del hepatocito, luego se transfiere a las HSC donde se reesterifica y se almacena en gotas de lípidos. Esta transferencia ocurre principalmente en tiempos de ingesta de retinoides suficiente o excesiva, de modo que estas reservas de retinoides pueden ser utilizadas y movilizadas en tiempos de deficiencia de vitamina A. Los primeros estudios sugirieron que esta transferencia está mediada por la proteína de unión a retinol (RBP). Blomhoff y col. informaron que los anticuerpos contra RBP bloquearon completamente la transferencia de retinol de los hepatocitos a las HSC (Blomhoff *et al.*, 1988).

- **Almacenamiento de retinoides en el HSC como éster de retinilo en gotas de lípidos**

El papel de las gotitas de lípidos HSC en el almacenamiento de retinoides: la característica más distintiva de HSC es la presencia de numerosas gotitas de lípidos que contienen éster de retinilo en el citoplasma, que recientemente se ha propuesto que sean orgánulos especializados para el almacenamiento de retinoides (Blaner *et al.*, 2009). El contenido único de retinoides de estas gotitas, su capacidad de respuesta al estado de los retinoides en la dieta, su dependencia de la síntesis del éster retínico y su pérdida en diferentes tipos de enfermedades hepáticas. Estos estudios han demostrado un fuerte papel regulador de los retinoides en la fisiología de las gotas de lípidos HSC.

- **Esterificación del retinol en el HSC**

Después de la transferencia del hepatocito al HSC, el retinol se esterifica de nuevo a retinil éster para almacenarlo en las gotitas de lípidos del HSC. Una vez en el HSC, el retinol se une a CRBPI y se transfiere a LRAT para la esterificación (Boulanger *et al.*, 2003). La unión de retinol a CRBPI es necesaria para su transporte en el ambiente acuoso del citosol y se ha propuesto para evitar que las enzimas dependientes de acil CoA en el hígado catalicen la formación de éster de retinilo. Tanto LRAT como CRBPI están enriquecidos en HSC (Blomhoff *et al.*, 1991; Blaner *et al.*, 2009), y ambas proteínas son necesarias para asegurar la acumulación óptima de HSC de las reservas de retinoides.

3.3.8. Requerimientos de Vitamina A, referidos en betacaroteno en cabras lecheras

Las vitaminas son nutrientes con alta actividad biológica y esenciales para un óptimo funcionamiento de todos los tejidos y como resultado un excelente estado de salud y desempeño, tanto productivo como reproductivo, (NRC, 1981). La vitamina A puede ser suministrada en los ingredientes de la dieta, así como sus precursores. De acuerdo a la NRC (2007), un equivalente de retinol (RE) es equivalente a 1 µg de trans-retinol, 5 µg de trans β-caroteno, o 7 µg de otros carotenoides pro-vitamina A. Además, 671 UI de vitamina A equivalen a 1 mg⁻¹ de betacaroteno y 436 UI de vitamina A = mg⁻¹ de otros carotenoides comunes. La ecuación propuesta para los requerimientos diarios de vitamina A para el mantenimiento-crecimiento, de animales con un peso de 10-40 kg⁻¹ y ganancias de peso diarias entre los 25 y 300 g⁻¹ (NRC, 2007), es la siguiente:

- **$A, RE \text{ kg}^{-1} = 31,40 \times PV$**

Dónde:

PV = peso vivo del animal en kg⁻¹; RE = equivalentes de retinol. 1 RE = 1 µg de trans-retinol, 5 µg de trans β-caroteno, ó 7 µg de otros carotenoides pro-vitamina A. Además, 671 UI de vitamina A = mg⁻¹ de β-caroteno y 436 UI de vitamina A = mg⁻¹ de otros carotenoides comunes.

Ecuación para los requerimientos de vitamina A para crecimiento de cabras lecheras.

- $A, \text{ RE kg}^{-1} = 100 \times \text{PV}$

Dónde:

PV = peso vivo del animal en kg^{-1} ; RE = equivalentes de retinol.

Cuadro 1. Requerimientos de vitamina A para el mantenimiento y suma de mantenimiento y ganancia de peso de cabras lecheras en crecimiento, expresados en RE d^{-1} y Betacaroteno mg d^{-1} , de acuerdo a la NRC, 2007.

Peso corporal (kg)	Ganancia diaria de peso (g)	Vit. A (RE d^{-1})	β -caroteno (mg d^{-1})
10	0 - 200	1 000	5
20	0 - 250	2 000	10
30	0 - 300	3 000	15
40	0 - 300	4 000	20

RE= equivalentes de retinol.

3.3.9. Betacaroteno como Antioxidante

Los radicales libres presentan un electrón desapareado de electrones o impar en el orbital externo, y se pueden formar cuando el oxígeno interactúa con ciertas moléculas. Algunos ROS son anión superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), otras especies reactivas importantes son el oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$), resultado de la excitación electrónica del estado basal del oxígeno molecular (triplete), y los radicales peróxidos, presentes en la peroxidación lipídica (Sies, 1997).

El estrés oxidativo es cuando la producción de estas sustancias prooxidantes supera a la capacidad de respuesta antioxidante del organismo. Si esto ocurre, las células pueden funcionar mal o morir. Para prevenir el daño de los radicales libres, el organismo tiene un sistema de defensa de antioxidantes (Barnham *et al.*, 2004).

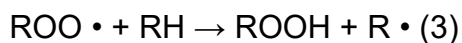
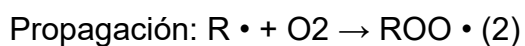
Todas las células en los organismos eucariotas tienen enzimas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres. De estas defensas antioxidantes que posee la célula las tres clases principales de enzimas son, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH-px) (Sies, 1997).

Existen además una gran variedad de antioxidantes exógenos, entre los que destacan: la vitamina C o ácido ascórbico, la vitamina E, alfa tocoferol y los carotenoides, además, el selenio, un metal traza que se requiere para la función adecuada de uno de los sistemas de enzimas antioxidantes del organismo a veces se incluye en esta categoría. El organismo no puede fabricar estos micronutrientes, por lo que deben suministrarse en la dieta (Elejalde-Guerra, 2001).

Los carotenoides poseen especial habilidad para destruir directamente los radicales libres (Stahl y Sies, 2005). De hecho, estos pigmentos resultan particularmente eficientes a la hora de neutralizar los radicales peróxidos (ROO), los cuales están directamente relacionados con el mecanismo de peroxidación lipídica (Wang, 2006).

- **La oxidación lipídica no enzimática o peroxidación lipídica**

Una reacción química que generalmente tiene lugar a temperatura ambiente entre el oxígeno atmosférico y el compuesto orgánico generalmente se conoce como autoxidación. Una característica importante de la autoxidación es que es autocatalítica. La tasa de oxidación espontánea es lenta al principio y aumenta a medida que avanza la reacción (Halliwell, 1995). La autoxidación es una reacción en cadena de radicales libres que consiste en los pasos de iniciación, propagación y terminación (reacciones 1-4).



Terminación: $\text{ROO} \bullet + \text{ROO} \bullet \rightarrow [\text{ROOOOR}] \rightarrow \text{productos no radicales (4)}$

En la etapa de iniciación, los lípidos poliinsaturados (RH) pueden formar radicales alquilo ($\text{R} \bullet$) que reaccionan muy rápidamente con el oxígeno para formar radicales peroxilo ($\text{ROO} \bullet$). En la 3ª etapa de propagación, una reacción en cadena con más lípidos produce hidroperóxidos (ROOH), es decir, productos de oxidación primaria. Estos hidroperóxidos se descomponen en presencia de metales para producir radicales alcóxido ($\text{RO} \bullet$), que se escinden en una mezcla compleja de aldehídos y otros productos, es decir, productos de oxidación secundaria (Frankel, 1984; Halliwell, 1995).

3.3.10. Respuesta a la suplementación de betacaroteno en animales

- **Las respuestas en la producción**

Se ha demostrado que los carotenoides tienen acciones biológicas independientes de la vitamina A (Arechiga *et al.*, 1988; Chew, 1995). La investigación de la Universidad de Florida indicó un aumento significativo en la producción de leche en vacas lecheras que reciben betacaroteno suplementario (Arechiga *et al.*, 1988). En este gran estudio de tres partes con manejo intensivo, las vacas suplementadas (400 mg/día) produjeron de 6.2 a 11.3 por ciento más de leche que los controles no suplementados. Además, para las vacas alimentadas con betacaroteno suplementario por 90 días, la tasa de preñez a los 120 días después del parto aumentó en (35.4% vs. 21.1%)

Algunos estudios han encontrado que la suplementación de betacaroteno afecta de manera positiva la producción de leche (Oldham *et al.*, 1990), al suplementar vacas con 300 mg kg peso⁻¹ de betacaroteno, observaron un incremento en la producción de leche en un 6.4%. Del mismo modo ganado expuesto a estrés calórico complementado con 400 mg kg peso⁻¹ de BC aumentó la producción láctea acumulada en un 11% (Arechiga *et al.*, 1988).

La vitamina A y el betacaroteno tienen un papel importante en la protección de los animales contra numerosas infecciones, incluida la mastitis. Los agentes patógenos potenciales están regularmente presentes en el orificio del pezón y, en circunstancias adecuadas, pueden invadir e iniciar la mastitis clínica. Cualquier estado insalubre del epitelio aumentaría la susceptibilidad de una glándula mamaria a la invasión de patógenos. Hay informes de mejoría de la salud mamaria en vacas lecheras suplementadas con betacaroteno y vitamina A durante los períodos secos y lactantes (Chew, 1995). Los neutrófilos polimorfo nucleares (PMN) son la línea principal de defensa contra las bacterias en la glándula mamaria. La suplementación con betacaroteno parece ejercer un efecto estabilizador sobre la función de PMN y linfocitos durante el período de secado (Chew, 1993). El betacaroteno aumentó la actividad bactericida de la sangre y la leche PMN, contra *S. aureus*, pero no afectó la fagocitosis. La vitamina A no tuvo efecto o suprimió la actividad bactericida y la fagocitosis. El control de los radicales libres es importante para la actividad bacteriana pero no para la fagocitosis. La actividad antioxidante de la vitamina A no es importante, no apaga ni elimina los radicales libres. El betacaroteno, por otro lado, tiene propiedades antioxidantes significativas y apaga eficazmente los radicales libres de oxígeno singlete (Elejalde-Guerra, 2001).

- **Inmunidad**

En gran parte debido al papel del betacaroteno como antioxidante, se puede incrementar la respuesta inmunitaria en el ganado lechero, reportaron que las vacas con baja concentración plasmática de vitamina A y betacaroteno tuvieron mayores puntajes en los exámenes de mastitis en la prueba California (Chew, 1993), al suplementar con 300 mg kg peso⁻¹ de betacaroteno, 53 KUI vitamina A, 80 KUI vitamina A, 53 KUI vitamina A, o sin suplemento en los 30 días antes parto, los datos en porcentajes de vacas con un recuento de células somáticas (RCS) > 500.000 fueron 13, 27, 54 y 67%, respectivamente, lo que indica que el betacaroteno mostró un efecto positivo en la respuesta inmune.

Lucas (2005), suplementó con 300 mg^{-1} de betacaroteno, lo que resultó en la reducción numérica de RCS en el contenido de la leche, sin mejorar significativamente la producción de leche. Otros investigadores no han encontrado indicios de que el betacaroteno mejora la función inmune (Bindas 1984), encontraron que la suplementación de 600 mg kg^{-1} de BC por día no afectó el RCS, Mientras que Oldham *et al* (1990), no observaron disminución en la incidencia de mastitis al suplementar las vacas con betacaroteno, sin embargo, encontraron que cuando se produjo un incremento de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de retinol en la concentración sérica durante la semana antes del parto, hubo una reducción del 60% en mastitis clínica en la lactancia temprana.

- **Parámetros reproductivos**

La suplementación de betacaroteno mejoró la tasa de concepción, la involución uterina y la ovulación, así como la reducción en la incidencia de quistes ováricos y muerte embrionaria temprana. Además, los niveles de betacaroteno en la dieta pueden estar relacionados con la fertilidad como se evidencia por el aumento de las concentraciones de BC en el ovario, sobre todo el cuerpo lúteo (Chew, 1995). Los beneficios de la suplementación con BC en vaca lechera puede estar relacionado con la conversión de la circulación de BC en vitamina A, específicamente en el útero y los ovarios (Schweigert, 2003).

Rakes *et al.* (1984), encontraron que la suplementación con 300 mg d^{-1} de BC disminuyeron los días al primer estro y el cuello uterino redujo su diámetro. El efecto de los suplementos de betacaroteno en la reproducción ha sido reportado en vacas con quistes ováricos las cuales presentaban bajas concentraciones plasmáticas de BC ($11 \pm 2 \text{ mg dL}^{-1}$) con respecto a las vacas sin quistes ováricos ($33 \pm 4 \text{ mg dL}^{-1}$). Asimismo, Graves-Hoagland *et al.* (1988), demostraron que los niveles de betacaroteno en plasma, se relacionaron positivamente con la síntesis de producción de progesterona en las células del cuerpo lúteo y determinaron que la concentración de betacaroteno en plasma estaba relacionado con la calidad del embrión en vacas superovuladas. Las concentraciones plasmáticas

de betacaroteno por encima de 200 mg dL⁻¹ tendieron a aumentar el número de cuerpos lúteos y el total de embriones recuperados y de manera significativa mejorar el número de embriones transferibles normales.

Cuando el ganado vacuno se suplementó con 400 mg d⁻¹ de BC, se incrementó la tasa de preñez de vacas con estrés calórico a los 120 y 90 días después del parto en 35.4% y 21.1% (Arechiga *et al.*, 1988). En el caso de las concentraciones de betacaroteno en plasma de vacas que ovularon durante la primera ola folicular posparto presentaron mayor media que vacas anovulatorias ($2.97 \pm 0.24 \text{ mg mL}^{-1} \pm 1.53$ vs 0.14 mg mL^{-1}) (Kawahsima, 2010). Este mismo grupo de investigadores suplementaron con 500 o 2,000 mg de betacaroteno por día durante el período seco, encontraron un aumento en el número de vacas ovulando en la primera ola folicular posparto (Kawahsima, 2010).

Estudios recientes sobre el efecto del BC en la actividad reproductiva en cabras muestran un efecto positivo sobre la función ovárica, en especial en las fases folicular, lútea, y en la síntesis de P4 (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2007; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2008). La suplementación en cabras adultas con 50 mg de BC por día durante un periodo de 51 días, bajo fotoperiodo natural, mostraron mayor número total de cuerpos lúteos (CLT) que el grupo control (3.4 vs 2.8), así como una mayor concentración sérica de progesterona, respecto del grupo control (5.6 vs $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2008).

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Short-term Betacarotene Supplementation Positively Affects Ovarian Follicular Development and Ovulation Rate in Goats

G. Arellano-Rodriguez², C.A. Meza-Herrera^{1*}, R. Rodriguez-Martinez²,
G. Velazquez-Mendez¹, M. Mellado², H. Salinas²,
M.A. Perez-Razo⁴, F. Sanchez⁵

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas
Universidad Autónoma Chapingo

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales
Agrícolas y Pecuarias

⁴Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan

⁵Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco
México

(Received January 20, 2007; accepted August 02, 2007)

Abstract

Arellano-Rodriguez, G., Meza-Herrera, C.A., Rodriguez-Martinez, R., Velazquez-Mendez, G., Mellado, M., Salinas, H., Perez-Razo, M.A. and Sanchez, F. 2007. Short-term betacarotene supplementation positively affects ovarian follicular development and ovulation rate in goats. *J. Appl. Anim. Res.*, 32: 177-180.

This study evaluated the effect of short-term betacarotene supplementation in goats upon ovarian activity. Adult goats (n=22, 34 mo.) were randomly assigned to one of the two experimental groups: 1) Betacarotene (BETA, n=10) and 2) Control (CONT, n=12). Once estrually synchronized with P4-vaginal sponges, the BETA group received 50 mg of betacarotene on a daily basis during 35 d pre- and 17 d post-ovulation. Once ovulation occurred, towards the end of the late luteal phase (d 18), transrectal ultrasonographic scanning was performed in all animals to evaluate total follicles (FT), corpus luteum number (CLT) and total ovarian activity (TOA). The BETA group goats had higher ovarian activity (P=0.07). Results suggest that betacarotene supplementation positively affected ovarian activity in goat.

Key words: Goat, betacarotene, ovarian function, follicular growth, corpus luteum number.

Introduction

Ovarian activity and ovulation rate are influenced by nutrition status, supplementary

feeding and body reserves (Williams *et al.*, 2001). Indeed, a short-term supplementation of both protein and energy can increase ovulation rate (Scaramuzzi *et al.*, 2006), indicating that ovarian response to nutritional supplementation is a tool that would allow to increase the reproductive efficiency for the benefit of goat farmers.

*Corresponding author: Galeana 585 Poniente, Colonia Centro, Lerdo, Durango, Mexico 35159,
E-mail: cmeza2000@hotmail.com

In both herbivorous and omnivorous species, β -carotene is an important source of vitamin A, but besides this function as a systemic or local vitamin A source, β -carotene has attracted attention because of its possible importance in the reproductive performance of different species of farm animals (Schweigert *et al.*, 2001). There is increasing evidence that β -carotene may be necessary for optimal steroid production, possibly acting as an anti-oxidant (Arikan and Rodway, 2000). The aim of this experiment was to evaluate the betacarotene supplementation on reproductive efficiency as measured by total ovarian activity in goat.

Materials and Methods

Goats ($n=22$, 34 mo old, 46.01 ± 5.05 kg, Criollo $\times$ Alpine and Saanen) were fed on a diet based on alfalfa hay, corn silage and corn grain in order to meet 100% of their nutritional requirements adjusted to body weight (NRC, 1998). Goats received water, shades and mineral salts *ad libitum* during the experimental period (51 d). Goats were randomly distributed in two experimental groups: 1) BETA ($n=10$, BW= 44.8 ± 1.45 kg), with daily supplementation of betacarotene (50 mg goat⁻¹, Syntex SA. de CV.) and 2) CONTROL, without supplementation (CONT, $n=12$; BW= 45.3 ± 1.32 kg).

Goats were estrually synchronized with intravaginal sponges impregnated with progesterone (Intervet International B. V., Boxmeer-Holland, Intervet, S. A., France). Sponges were withdrawn nine days after the insertion of the sponges and goats were injected with cloprostenol IM (Prosolvon C[®], Intervet International B. V., Boxmeer-Holland), a prostaglandin F₂ α analog, 1.0 ml per animal (0.075 mg goat⁻¹), to provoke corpus luteum regression and to cause, in turn, follicular development and ovulation.

On day 17 after the second ovulation, ovarian activity was evaluated by ultrasonographic scanning (Toshiba Medical Systems, Ltd, Crawley, UK) with a 7.5 Mhz

linear transducer for veterinarian use and according to the transrectal ultrasonographic method suggested by Griffin and Ginther, (1992) and Dickie *et al.* (1999). The number and diameter of ovarian structures (follicle and corpus luteum) were recorded and photographed.

Data were subjected to analyses of variance (ANOVA) in a completely randomised design (Morris, 1999). The PDIFF option was used to evaluate least square mean differences between experimental groups by the LSMEAN procedure of the PROC GLM. All the statistical analyses were performed using the SAS Program (Littell *et al.*, 1991; 1998). The reported values are least square means $\pm$ standard error.

Results and Discussion

The results observed in the present study (Table 1) confirm a positive betacarotene effect on the main ovarian cellular groups, either in their luteal or follicular phase and coincide with the observed increased corpus luteum number as well as the increased total ovarian activity in those goats supplemented with betacarotene. According to Cassano *et al.* (1999), oxidative damage to the oocyte or

Table 1

Least square means for body weight (BW), body condition score (BCS), total follicles (FT), total corpus luteum (CLT) and total ovarian activity (TOA=FT+CLT) in goats supplemented with betacarotene (BETA, 50 mg goat⁻¹ day⁻¹) and no supplemented goats (CONTROL)

	BETA	CONTROL	SE ¹
BW, kg	44.8 ^a	45.3 ^a	1.32
BCS, units	3.2 ^a	3.3 ^a	0.06
FT, units	4.6 ^a	3.5 ^b	0.52
CLT, units	3.4 ^a	2.8 ^b	0.22
TOA, units	8.0 ^a	6.3 ^b	0.57

¹SE, most conservative LSM-standard error.

^{a,b}Means followed by different superscripts differ ($P<0.07$).

follicular cells were suggested to trigger atresia. As mentioned by Schweigert *et al.* (2003), carotenoids are transferred into follicular fluid where they might serve as antioxidants and (or) precursors of retinoids which, in turn, modulate follicular or oocyte functions.

In fact, betacarotene acts against lipid peroxidation as an antioxidant molecule protecting several reproductive structures from oxidative DNA-damage (Kim *et al.*, 2007). Betacarotene seems to act as an ovarian-protective molecule, not only as luteoprotective (Haliloglu *et al.*, 2002) but also improving embryo production and quality in superovulated cows (Sales *et al.*, 2007), optimizing reproductive performance in females. Betacarotene up-take by the ovary and uterine tissues increases in a dose-dependent manner, enhancing the steroidogenic activity at ovarian level, promoting an optimal ovarian function and a better uterine environment for embryonic survival and development (Chew *et al.*, 2001). Further studies should elucidate if the positive effect of betacarotene supplementation prior to mating upon ovarian activity, is associated with changes in the hormonal profile of gonadotrophic hormones like LH or FSH and/or other metabolic hormones like insulin, growth hormone or insulin-like growth factors.

References

- Arikan, S. and Rodway, R.G. 2000. Effects of high density lipoprotein containing high or low β -carotene concentrations on progesterone production and β -carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 253-263.
- Cassano, E., Tosto, L., Balestrieri, M., Zicarelli, L. and Abrascia, P. 1999. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol. Biochem.*, 9(2): 106-116.
- Chew, B.P., Weng, B.B., Kim, H.W., Wong, T.S., Park, J.S. and Lepine, A.J. 2001. Uptake of betacarotene by ovarium and uterine tissues and effects on steroidogenesis during the estrous cycle in cats. *Amer. J. Vet. Res.*, 62: 1063-1067.
- 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.
- Griffin, J.K. and Ginther, O.J. 1992. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci.*, 70: 963-972.
- Haliloglu, S., Baspinar, N., Serper, B., Erdner, H. and Bulut, Z. 2002. Vitamin A and betacarotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 37(2): 96-99.
- Kim, Y., Luan, F., Yeum, K.J., Chongviayaphan, L., Choi, S.W., Russell, R.M. and Wang, X.D. 2007. The effect of combined antioxidant (betacarotene, alphatocopherol and ascorbic acid) supplementation on antioxidant capacity, DNA single breaks and levels of insulin-like growth factor-1/IGF-binding protein 3 in the ferret model of lung cancer. *Int. J. Cancer*, 120: 1847-1854.
- Littell, C.R., Freund, J.R. and Philip, C. 1991. *SAS® System for Linear Models*, Third Edition, SAS Institute Inc. Cary, NC, 329 pp.
- Littlell, C.R., Henry, P.R. and Ammerman, C.B. 1988. Statistical analyses for repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*, 78: 1210-1231.
- Morris, T.R. 1999. *Experimental Designs and Analysis in Animal Sciences*. CABI Publishing, New York, NY, USA. p. 208.
- NRC. 1998. *Nutrient Requirement of Goats: Angora, Dairy and Meat Goats in Temperate and Tropical Countries*. 1st edition. National Academy Press. Washington, D.C., USA.
- Sales, J.N., Dias, L.M., Viveiros, A.T., Pereira, M.N. and Souza, J.C. 2007. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with betacarotene and tocopherol. *Anim. Reprod. Sci.*, (In press, DOI: 10.1016/j.animreprosci.2007.04.001).
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M. and Somchit, A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46: 339-354.
- Schweigert, F.J., Buchholz, I., Schyhmacher, A. and Gropp, J. 2001. Effect of dietary β -carotene on the accumulation of β -carotene and vitamin A in plasma tissues of gilts. *Reprod. Nutr. Develop.*, 41: 47-55.
- Schweigert, F.J., Steinhager, B., Raïla, J., Siemann, A., Pret, D. and Buscher, U. 2003. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma

and follicular fluid of woman undergoing IVF. Hum. Reprod., 18: 1259-1264.

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.

जी.अरेल्लानो-रोद्रिगेज़, सी.ए.मेज़ा-हर्रेरा, आर. रोड्रीग्वेज़-मार्टिनेज़, जी.केलाब्रव्हेज़-मेन्डेज़, एम.मैल्लाडो, एच. सालिनास, एम.ए.पेरेज़-राजो, एफ.सैन्वेज़। बकरियों में बीटा-कैरोटिन के अल्प अवधि पूरक का बकरियों में डिम्बीय फालिकल विकास और डिम्बोत्सर्ग पर सकारात्मक प्रभाव होता है।

इस अध्ययन से बकरियों की अंडाशयी क्रियाशीलता पर अल्पावधि बीटा-कैरोटिन पूरक के प्रभाव का अध्ययन किया गया। बड़स प्रौढ़ बकरियों (34 माह आयु) को वार्षिक चिधि से 10 और 12 के दो वर्गों में बांट कर क्रमशः बीटा-कैरोटिनयुक्त (बीटा) या बीटा कैरोटिनहीन (नियंत्रक) आहार खिलाया गया। पी 4 खेनीय रखाज से एक बार रतिजीव तुल्यकालन के बाद डिम्बोत्सर्ग से 35 दिन पूर्व और 17 दिन परचातु तक प्रतिदिन 50 मि.ग्रा बीटा कैरोटिन दिया गया। विलम्बित ल्यूटिनासी समय में (18वें दिन) एक बार डिम्बोत्सर्ग के बाद सभी पशुओं में सकल फालिकल, कार्यरत ल्यूटियम की संख्या और सकल अंडकोषी क्रियाशीलता जानने के लिए मल्लसय पच से अल्ट्रासोनोग्राफी क्रमवीक्षण किया गया। बीटा वर्ग की बकरियों में सार्थकतः अधिक डिम्बांधीय क्रियाशीलता थी। परिणाम दर्शाते हैं कि बीटा कैरोटिन पूरक से बकरियों की अंडकोषीय क्रियाशीलता पर सार्थक प्रभाव पड़ता है।

ORIGINAL ARTICLE

Short-term intake of β -carotene-supplemented diets enhances ovarian function and progesterone synthesis in goats

G. Arellano-Rodriguez¹, C. A. Meza-Herrera², R. Rodriguez-Martinez¹, R. Dionisio-Tapia², D. M. Hallford³, M. Mellado¹ and A. Gonzalez-Bulnes⁴

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Mexico

² Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas Universidad Autónoma Chapingo, Mexico

³ Department of Animal and Range Sciences, New Mexico State University, NM, USA, and

⁴ Departamento de Reproducción, INIA, Spain

Keywords

goats, β -carotene, corpus luteum, luteal function, progesterone

Correspondence

Dr. C. A. Meza-Herrera, Galeana 585 Poniente, Colonia Centro, Lerdo, Durango, Mexico 35150. Tel: +52 (871) 4552691; Fax: +52 (872) 776-0043; E-mail: cmeza2000@hotmail.com

Received: 19 March 2008;

accepted: 15 July 2008

Summary

The effect of β -carotene supplementation upon luteal activity, measured as number (CLT) and volume (VLT) of corpus luteum, and P4 synthesis in goats, was evaluated. Goats ($n = 22$, 34 months) were randomly assigned to one of two experimental groups: (i) β -carotene [Beta, $n = 10$; body weight (BW) = 44.8 ± 1.45 kg], body condition score (BCS = 3.25 ± 0.07], and (ii) Control (Control, $n = 12$; BW = 45.30 ± 1.32 kg, BCS = 3.33 ± 0.06). Upon oestrus synchronization, the Beta group received 50 mg of β -carotene per day during 35 days pre- and 17 days post-ovulation. The day 4, 8, 12 and 16 post-ovulation, blood samples were collected for quantification of serum P4 concentrations by radioimmunoassay, and transrectal ultrasonographic scanning was performed at day 18 for evaluating CLT and VLT. Overall, CLT and VLT mean were 3.10 and 2211.1 mm³ respectively. The Beta-goats depicted both the largest values for CLT ($p = 0.07$) and serum P4 levels ($p = 0.05$), with no differences ($p = 0.53$) for VLT between treatments. Results suggest a higher efficiency within the cellular-enzymatic groups defining the steroidogenic pathways in the β -carotene-supplemented goats, generating a larger P4 synthesis. The last is essential for ovulation of healthy oocytes, maintenance of uterine quiescence, nourishment and survival of the embryo around implantation; all of them of paramount significance during the maternal recognition of pregnancy process.

Introduction

In ruminants, an inadequate nutrition is characterized by deficient metabolic and endocrine profiles which can compromise reproductive performance, causing retarded puberty onset, irregular oestrous cycles and a drop in the global reproductive efficiency (Popwell et al., 1996; Scaramuzzi et al., 2006; Meza-Herrera et al., 2007). Besides, maternal nutritional and metabolic environment are also critical

for compromising embryo and fetal viability (Maloney and Ress, 2005; Meza-Herrera et al., 2006) and long-term health and viability of the offspring (Symonds et al., 2007).

An important aspect that defines reproductive efficiency in ruminants is the process of maternal recognition of pregnancy (Spencer et al., 2007), which involves the establishment of a dialogue between the fetus and its mother in order to assure the synthesis and release of progesterone (P4) (Roberts

et al., 1996). In goats, a successful pregnancy depends on an adequate P4 secretion by corpus luteum; in turn, luteal function depends on an optimum balance of luteotropic (i.e. LH) and luteolytic factors (i.e. PGF₂ α) (Ford et al., 1996). In mammals, luteal steroidogenesis affects the function of several organs such as the uterus, ovary, mammary gland and brain; thus, P4 secretion is recognized as a key element in the normal regulation of female reproductive function (Dinny and Christine, 1999).

Carotenoids, on the other hand, are important both to humans and animals as precursors of vitamin A and retinoid (Chew et al., 1993; Hattori et al., 2000; Schweigert et al., 2003). β -Carotene, which is present in green plants but can be also chemically synthesized, has shown to have a key role in a wide range of biological processes (Schweigert, 1998). In fact, β -carotene is not only a retinol precursor, but also has gained consideration because of it functions similarly to vitamin E by acting as scavenger of free radicals, especially singlet oxygen, and, thus, as a potent antioxidant such as other carotenoids (Chew et al., 1993; Sies and Stahl, 1995; Greiwe-Crandell et al., 1997).

In addition, many gene products linked to reproduction are known to be modulated by retinoic acid, the product of retinol oxidation (Schweigert et al., 2003). Therefore, an optimal intake of β -carotene is hypothesized to have a positive effect on fertility (Arechiga et al., 1998). Most of the studies have been performed in animals, but results are contradictory; some authors reported negative effects (Folman et al., 1987), whilst others described an increased fertility (Arechiga et al., 1998). Most recent studies have shown a direct relationship between β -carotene concentration at ovarian level and size and P4 secretion by corpora lutea (Haliloglu et al., 2002), suggesting that β -carotene may have a positive effect in luteogenesis and luteal activity.

The purpose of this study was to evaluate whether the positive effects of β -carotene on the luteal function can be induced by exogenous supply. Thus, the effects of a short-term β -carotene nutritional supplementation on the number of corpora lutea (CLT), the total luteal volume (VLT) and the secretion of P4 were evaluated in goats.

Materials and methods

Institutional approval, animals and their feeding

The study was carried out at the Regional University Unit on Arid Lands of the Chapingo Autonomous University (URUZA-UACH), at the Southern Goat

Research Unit (26°N, 103°W, 1117 m), during November and December. Climatic characteristics for the area are warm-dry climate and mean annual precipitation and temperature of 217.1 mm and 22.3 °C respectively. The warmest month is June, with temperatures above 40 °C whilst the coldest month is January, with the lowest temperature below 0 °C.

Experimental groups were prepared during October, under a natural short-day photoperiodic scheme. Goats ($n = 22$, 34 months; Criollo $\times$ Alpine-Saanen), having a mean body weight (BW) of 46.01 ± 5.05 kg were fed with a diet based on alfalfa hay, corn silage and corn grain to fit 100% of their nutritional requirements adjusted to BW (NRC, 1988). Goats had free access to water, shades and mineral salts during the whole experimental period (51 days). The experimental groups were fed twice per day, with alfalfa hay and corn silage by the morning (07:00 hours), and corn grain by the afternoon (18:00 hours); always under natural light conditions. All the methods used in this study were in accordance with accepted international guidelines (FASS, 1999).

Experimental design and treatment groups

Goats were randomly distributed in two experimental groups: (i) Beta ($n = 10$, BW = 44.8 ± 1.45 kg), supplemented with β -carotene (50 mg per goat per day) (Syntex Mexico, SA. de CV.), and (ii) Control, without supplementation ($n = 12$; BW = 45.3 ± 1.32 kg). Goats were fed with the basal diet during the whole experimental period, which consisted of 34 days before and 17 days after ovulation, from October to December, under a decreasing photoperiodic scheme.

Oestrus synchronization, blood sampling and P4 quantification

Oestrus was synchronized by using intravaginal sponges containing 45 mg of fluorogestone acetate (Chronogest®; Intervet International B. V., Boxmeer, the Netherlands) for 10 days and a single i.m. dose of 1 ml of a prostaglandin F₂ α analogue (0.075 mg per goat of cloprostenol; Prosolvin-C®; Intervet International B. V.).

During the cycle following the synchronized ovulation, at days 4, 8, 12 and 16, blood samples were collected by jugular venopuncture with 0.8 $\times$ 38-mm hypodermic sterile needles (PrecisionGlide™; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and 10-ml sterile vacutainer serum tubes (Becton Dickinson).

Samples were allowed to clot during 30 min, and then centrifuged (1500 *g*, 15 min). Serum samples were collected in 1.5-ml polypropylene tubes (Axygen^{MR} Scientific, Union City, CA, USA) and stored at -20 °C until assayed.

In total, four samples per goat were collected (40 Beta) and 44 (Control). Serum P4 concentrations were determined in duplicate by radioimmunoassay (RIA) by using a solid-phase commercial RIA kit (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA), according to the procedures described by Schneider and Hallford (1996). Intra-assay coefficient of variation was 7.5% and detection limit reached 30 pg ml⁻¹. Hormonal assays were made at the Endocrinology Laboratory of the Animal Science Department of the New Mexico State University, Las Cruces, NM, USA.

Ultrasonographic analysis of ovarian activity

To evaluate the luteal function on day 18 after the second ovulation, ultrasonographic scanning was performed by one skilled operator with a 7.5 MHz linear-array transducer for veterinarian use (Toshiba Medical Systems, Crawley, UK). The number of corpus luteum observed in each ovarian structure was recorded and measured according to the procedures outlined by Dickie et al. (1999). Ovaries were visualized at an image magnification of 1.5 $\times$, and number and size of all follicles >2 mm in diameter were registered. Ultrasonographic images were also recorded on videotapes for retrospective analysis. Once obtained the largest and lowest diameters, VLT was calculated by using the following formula: $VLT = (4/3\pi \times R^3) \times CLT$, where R is the mean ratio and CLT is the number of corpora lutea.

Statistical analyses

Body weight, body condition score (BCS), CLT and VLT were evaluated by analyses of variance (ANOVA), by using a completely random design with two treatments and 10–12 replicates by treatment (Snedecor and Cochran, 1967). Serum P4 levels were analysed by ANOVA in a completely random design with a split-plot arrangement of treatments for repeated measures across time (Littell et al., 1998). Treatment effect was included in the main plot, using the goat term within treatment to calculate the error. Sampling time and treatment by time interactions were included in the subplot and were tested using the residual mean square. When significant F values were observed, mean separation considered

LSMEANS-PDIFF option of the PROC GLM. All statistical analyses considered the use of the SAS software (Littell et al., 1991). Reported values are defined as least square means $\pm$ SE.

Results

Least square means for BW (kg), BCS (units), CLT, VLT (mm³) and P4-serum level (P4, ng ml⁻¹) are shown in Table 1. The overall CLT mean was 3.0 ± 0.2 , with the Beta group having the largest CLT number ($p = 0.07$) in relation to the Control group. Overall, VLT mean was 2.162 ± 543 mm³, without differences between groups ($p = 0.53$) for this variable. Overall mean serum P4 levels were 4.8 ± 0.3 ng ml⁻¹, with the Beta group bearing higher serum P4 concentrations ($p = 0.05$) than the Control group. Serum P4 levels across time, showed sustained increases ($p = 0.04$) across sampling times (Table 2). In fact, P4 levels increased from day 4 to 8, and showed a slight decrease at day 16; this P4 secretion pattern being similar between and within treatments.

Table 1 Least square means for body weight (BW), body condition score (BCS), total corpus luteum number (CLT), total luteal volume (VLT) and serum progesterone concentration (P4) in goats supplemented with β -carotene (Beta, 50 mg per goat per day) and non-supplemented goats (Control) in northern Mexico (26°N)

	Beta	Control	SE*	OSL†
BW (kg)	44.8 ^a	45.3 ^a	1.32	0.83
BCS (units)	3.2 ^a	3.3 ^a	0.06	0.42
CLT (units)	3.4 ^b	2.8 ^a	0.22	0.07
VLT (mm ³)	1978.2 ^a	2444.0 ^a	501.1	0.53
P4 (ng ml ⁻¹)	5.6 ^b	4.5 ^a	0.37	0.05

*Most conservative LSM-standard error.

†Observed significance level.

^{a,b}Different superscripts denote statistically different values within variables ($p \leq 0.07$).

Table 2 Least square means for progesterone serum concentration (P4, ng ml⁻¹) on days 4, 8, 12 and 16 post-ovulation during November–December, in goats supplemented with β -carotene (Beta, 50 mg per goat per day), and non-supplemented goats (Control) in northern Mexico (26°N)

	Days after ovulation				SE*	OSL†
	4	8	12	16		
P4 (global)	2.0	5.2	6.7	5.5	0.4	0.04
P4 Beta	1.6	6.0	7.2	6.9	0.7	0.08
P4 Control	2.5	4.0	5.9	5.5	0.6	0.001

*SE, most conservative LSM-standard error.

†OSL, Observed significance level.

Discussion

Current results give evidences for a positive effect of β -carotene supplementation on the luteal function, in terms of P4 secretion, during the early luteal phase; these results can be extrapolated to the pre-implantational period in pregnant females. This fact suggests a better efficiency in the metabolic performance by luteal cells in the β -carotene-supplemented group. From a functional point of view, it is possible to hypothesize two mechanisms of action. First, this effect may be related to possible effects on LH stimulation via the protein kinase A (PK-A) second messenger system. Indeed, in the cytoplasmic membrane, LH links to its receptor activating PK-A, and as a consequence, the cytochrome P450 enzyme transforms cholesterol into pregnenolone, which in turn is converted in the endoplasmic reticulum to P4 by means of 3β HSD/ Δ^5 , Δ^4 isomerase enzyme (Niswender et al., 2000).

On the other hand, β -carotene, acting as an antioxidant, may improve the ability of luteal cells to synthesize P4 in a scenario rich in free oxygen (Tilly, 1996). During steroidogenesis, the mitochondrial P450 system has shown to produce oxygen radicals, such as cytochrome P450 and adrenoxin, which can provoke irreversible damage to the molecules in the surrounding environment. The mitochondrial system that first catalyses P450 and the proportion that limits the steroidogenesis process is highly expressed in the corpus luteum, which is also characterized by their high antioxidant level (Rapoport et al., 1998). Antioxidants play an important role in protecting the cell from free oxygen radicals, which are harmful during steroidogenesis. Reinforcing this hypothesis, free oxygen radicals can be involved in both luteolysis and apoptosis of luteal cells during the reproductive cycle (Riley and Behman, 1991).

According to our results, β -carotene supplementation would increase not only the ovulation rate but also the P4 synthesis. Thus, as a precursor of vitamin A, β -carotene has gained specific interest; vitamin A strongly affects cellular development, differentiation and morphogenesis through retinoic acid. In turn, by interacting with nuclear receptors, retinoic acid can influence the activation of several genes as well as the expression of numerous proteins (Zile, 1998).

The observed P4 increments in our study are similar to those reported by Weng et al. (2000), who mentioned increase in P4 levels due to β -carotene supplementation, concluding that β -carotene supplementation affected plasma P4 concentration without effects on 17β -oestradiol concentration and on total

of uterine protein. In other studies, however, β -carotene was found to have no effect on the plasma P4 levels: in gilts on day 12 of gestation (Schweigert et al., 2002), in dairy cattle receiving oral administration of β -carotene (Chew et al., 1982) as well as after parenteral β -carotene administration in sows (Coffey and Britt, 1993).

In both experimental groups, serum P4 levels reached their highest value at day 12; without differences between treatments with regards to the levels of P4 secretion across time. Both dynamic secretion and synthesis of P4 in our trial coincide with the P4 secretion dynamics during the luteal phase reported by Niswender et al. (2000). No significant correlations among corpora lutea number and P4 synthesis were observed in this study. On this respect, Haliloglu et al. (2002) reported that supplemental β -carotene levels were correlated ($p < 0.05$) with CL diameter, observing a positive correlation between P4 and corpus luteum diameter. As no differences were observed between treatments for the total volume of luteal tissue, a possible explanation of our results could be related to a better enzymatic efficiency in the Beta group, which, in turn, could be related to an enhanced P4 synthesis.

During steroidogenesis, the mitochondrial P450 system has shown to produce oxygen radicals – such as cytochrome P450 and adrenoxin – that can provoke irreversible damage to the molecules in the surrounding environment. The mitochondrial system that first catalyses P450 and the proportion that limits the steroidogenesis process are expressed in higher concentrations in both suprarenal cortex and corpus luteum. These steroidogenic tissues have been characterized by their higher antioxidant levels (Rapoport et al., 1998). It is possible to hypothesize that this physiological scenario could have been presented by the Beta group, generating a better efficiency in the steroidogenic pathway and, in turn, a better level of P4 synthesis.

Antioxidants play an important role protecting the cell from free oxygen radicals, which are harmful during steroidogenesis. Free oxygen radicals can be, from a functional point of view, involved in the conduction of both luteolysis process and apoptosis of luteal cells during each reproductive cycle (Riley and Behman, 1991). Results of this study suggest that short-term β -carotene supplementation can enhance the synthesis and secretion of P4 by luteal tissue. The last may be of significant importance both from a biological and economic stand-point. Particularly with respect to the maternal recognition of

pregnancy process, promoting a higher efficiency during embryo implantation process.

References

- Archiga, C. P.; Staples, C. R.; McDowell, L. R.; Hansen, P. J., 1998: Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *Journal of Dairy Science* **81**, 390–402.
- Chew, B. P.; Hollen, L. L.; Hillers, J. K.; Herlugsen, M. L., 1982: Relationship between vitamin A and β -carotene in blood plasma and milk and mastitis in Holsteins. *Journal of Dairy Science* **65**, 2111–2118.
- Chew, B. P.; Wong, T. S.; Michal, J. J., 1993: Uptake of orally administered B-carotene by blood plasma, leukocytes and lipoproteins in calves. *Journal of Animal Science* **71**, 730–739.
- Coffey, M. T.; Britt, J. H., 1993: Enhancement of sow reproductive performance by beta-carotene or vitamin A. *Journal of Animal Science* **71**, 1198–1202.
- Dickie, A. M.; Paterson, C.; Anderson, L. M.; Boyd, J. S., 1999: Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology* **51**, 1209–1224.
- Dinny, J. G.; Christine, L. C., 1999: Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* **18**, 502–519.
- FASS, 1999: *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA.
- Folman, Y.; Ascarelli, I.; Kraus, D.; Barash, H., 1987: Adverse effect of beta-carotene in diet on fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **70**, 357–366.
- Ford, M. M.; Thorburn, G. D.; Caddy, D. J.; Young, I. R., 1996: Pulsatile output of prostaglandin F₂ α does not increase around the time of luteolysis in the pregnant goat. *Biology of Reproduction* **61**, 411–415.
- Greiwe-Crandell, K. M.; Kronfeld, D. S.; Gay, L. S.; Sklan, D.; Tiegs, W.; Kronfeld, D., 1997: Vitamin A repletion in thoroughbred mares with retinyl palmitate or beta-carotene. *Journal of Animal Science* **75**, 2684–2690.
- Haliloglu, S.; Baspinar, N.; Serpek, B.; Erdem, H.; Bulut, Z., 2002: Vitamin A and beta-carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Domestic Animal Reproduction* **37**, 96–99.
- Hattori, M.; Takesue, K.; Nishida, N.; Kato, Y.; Fujihara, N., 2000: Inhibitory effect of retinoic acid on the development of immature porcine granulosa cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 53–61.
- Littell, C. R.; Freund, J. R.; Philip, C., 1991: *SAS® System for Linear Models*, 3rd edn. SAS Institute, Cary, NC.
- Littell, C. R.; Henry, P. R.; Ammerman, C. B., 1998: Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Sciences* **76**, 1216–1231.
- Maloney, C. A.; Rens, W. D., 2005: Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction* **130**, 401–410.
- Meza-Herrera, C. A.; Ross, T.; Hawkins, D.; Hallford, D. M., 2006: Interactions between metabolic status, pre-breeding protein supplementation, uterine pH, and embryonic mortality in ewes: preliminary observations. *Tropical Animal Health and Production* **38**, 407–413.
- Meza-Herrera, C. A.; Ross, T.; Hallford, D. M.; Hawkins, D.; Gonzalez-Bulnes, A., 2007: Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* **42**, 461–465.
- Niswender, D. G. N.; Jennifer, L. J.; Silva, P. J.; Rollyson, M. K.; McIntosh, E. W., 2000: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* **80**, 1–29.
- NRC, 1988. *Nutrient requirements of goats: angora, dairy and meat goats in temperate and tropical countries*. National Academy Press, Washington, DC, pp. 1–91.
- Popwell, J. M.; Estienne, M. J.; Kraeling, R. R.; Barb, C. R.; Whitley, N. C.; Udey, R. V.; Rampacek, G. B., 1996: The role of excitatory amino acids in pulsatile secretion of luteinizing hormone in gilts and barrows. *Journal of Animal Science* **74**, 1067–1073.
- Rapoport, R.; Sklan, D.; Wolfenson, A.; Shaham-Albalanc, Y.; Hanukoglu, I., 1998: Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochemistry and Biophysical Acta* **12**, 133–140.
- Riley, J. C.; Behrman, H. R., 1991: Oxygen radicals and reactiveoxygen species in reproduction. *Proceedings of the Society on Experimental Biology and Medicine* **198**, 781–791.
- Roberts, R. M.; Xie, S.; Mathialagan, N., 1996: Maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction* **54**, 294–302.
- Scaramuzzi, R. J.; Campbell, N. R.; Downing, J. A.; Kendall, N. R.; Khalid, M.; Muñoz-Gutiérrez, M.; Somchit, A., 2006: A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction, Fertility and Development* **46**, 339–354.
- Schneider, F. A.; Hallford, D. M., 1996: Use of a rapid progesterone radioimmunoassay to predict pregnancy and fetal numbers in sheep. *Sheep and Goat Research Journal* **12**, 33–38.
- Schweigert, P. J., 1998: Metabolism of carotenoids in mammals. In: G. Britton, S. Lissau-Jensen, H. Pfander (eds), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*, Vol. 3. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 249–284.
- Schweigert, P. J.; Kreiger, K.; Schmurnusch, U.; Schams, D.; Gropp, J., 2002: Effect of dietary β -carotene on the early embryonic development and uterine fluid

- composition in gilts. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **86**, 265–272.
- Schweigert, P. J.; Steihagen, B.; Ralla, J.; Seimann, A.; Peet, D.; Buscher, U., 2003: Concentrations of carotenoids, retinol and α -tocopherol in plasma and follicular fluid of woman undergoing IVF. *Human Reproduction* **18**, 1259–1264.
- Sies, H.; Stahl, W., 1995: Vitamins E and C, betacarotene and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1315–1321.
- Snedecor, G. W.; Cochran, W. G., 1967: *Statistical Methods*, 6th edn. The Iowa State Univ Press, Ames, IA.
- Spencer, T. E.; Johnson, G. A.; Bazer, F. W.; Burghardt, R. C.; Palmarini, M., 2007: Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development* **19**, 65–78.
- Symonds, M. E.; Stephenson, T.; Gardner, D. S.; Budge, H., 2007: Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. *Reproduction, Fertility and Development* **19**, 53–63.
- Tilly, L. J., 1996: The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Frontiers in Bioscience* **1**, d1–d11.
- Weng, B. C.; Chew, B. P.; Wong, T. S.; Park, J. S.; Kim, H. W.; Lepine, A. J., 2000: Betacarotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *Journal of Animal Science* **78**, 1284–1290.
- Zile, M. H., 1998: Vitamin A and embryonic development: an overview. *Journal of Nutrition* **128**, 455S–458S.

5. CONCLUSIONES GENERALES

La suplementación con Betacaroteno incrementa la actividad esteroideogénica y consecuentemente el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en cabras promoviendo así una función ovárica óptima. Tales efectos del betacaroteno se observaron a pesar de una reducción en la liberación pulsátil de LH. Mediante el presente proyecto de tesis se pudo demostrar que la suplementación con betacaroteno genera aumentos séricos en metabolitos sanguíneos tales como las proteínas totales, glucosa y colesterol; e incrementa la secreción pulsátil de progesterona, además de que se pudo revelar que la suplementación de betacaroteno disminuye la GH sérica, pero sin efecto sobre los niveles de IGF-1. Estos hallazgos pueden ser de gran importancia tanto desde el punto biológico como económico, así como también pueden generar importantes aplicaciones prácticas en otras industrias animales.

Debido a nuestro conocimiento fragmentario, se necesitan más estudios para comprender mejor las acciones fisiológicas precisas del betacaroteno en diferentes resultados reproductivos y escenarios fisiológicos, otros estudios destinados a dilucidar los efectos gonadotrópicos o metabólicos específicos de betacaroteno a nivel ovárico contribuirían a una mejor comprensión de la activación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal en la cabra. Esta es una importante línea de investigación para la industria animal y con posibles implicaciones traslacionales de relevancia clínica.

6. LISTA DE REFERENCIAS

- Abecia, J., Forcada, F. y González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, **130**(3-4), 173-179. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.011
- Aréchiga, C.F., Staples, C.R., Mc Dowell, L.R. y Hansen, P.J. (1988). Effects of Timed Insemination and Supplemental b-Carotene on Reproduction and Milk Yield of Dairy Cows Under Heat Stress¹. **J Dairy Sci** **81**, 390-402.
- Arellano-Rodriguez, G., Meza-Herrera, C., Rodriguez-Martinez, R., Velazquez-Mendez, G., Mellado, M. y Salinas, H. (2007). Short-term Betacarotene Supplementation Positively Affects Ovarian Follicular Development and Ovulation Rate in Goats. *Journal of Applied Animal Research*, **32**(2), 177-180. doi: 10.1080/09712119.2007.9706872
- Arellano-Rodriguez, G., Meza-Herrera, C., Rodriguez-Martinez, R., Dionisio-Tapia, R., Hallford, D., Mellado, M. y Gonzalez-Bulnes, A. (2008). Short-term intake of β -carotene-supplemented diets enhances ovarian function and progesterone synthesis in goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **93**(6), 710-715. doi: 10.1111/j.1439-0396.2008.00859.x
- Armstrong, G.A. y Hearst, J.E. (1996.). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB, J.* **10**, 228-237.
- Arrebola, F., Pérez-Marín, C.C. y Santiago-Moreno J. (2010). "Limitation of seasonality in reproductive parameters of mediterranean bucks, using photoperiod treatment." *Small Rum. Res.* **89**, 31-35.
- Arroyo, J. (2011). "Reproductive seasonality of sheep in Mexico." *Tropical and Subtrop. Agroecosyst.* **14**, 829-845.
- Avdi, M., Banos, G., Kouttos, A., Bodin, L. y Chemineau, P. (2003). Sources of variation and genetic profile of spontaneous, out-of-season ovulatory activity in the Chios sheep. *Genetics Selection Evolution*, **35**(1). doi: 10.1186/1297-9686-35-1-65

- Avdi, M., Driancourt, M. A. y Chemineau, P. (1993). Variations saisonni res du comportement d'oestrus et de l'activite  ovulatoire chez les brebis Chios et Serres en Gre ce. *Reprod Nutr Dev.* 33, 15-24.
- Balaro, M., de Mello, S., da Silva Santos, A., Cavalcanti, L., Almosny, N., Fonseca, J. y Brand o, F. (2018). Reproductive seasonality in Saanen goats kept under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 51(2), pp.345-353.
- Ballet, N.R., Robert, J.C. y Williams, P.E.V. (2000). *Vitamins in Forages*. . CAB International. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. eds. D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford y H.M. Omed.
- Barnham, K.J., Master, C.L. y Bush, A.I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. . *Nat Rev Drug Discov* 3. doi: 10.1038/nrd1330., 205-214.
- Barrell, G.K., Thrun, L.A., Brown, M.E., Viguie, C., Karsc, F.J. (2000). Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biol Reprod* 63, 769-774.
- Beatty, R.A. (1970). The genetics of the mammalian gamete. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 45:73-119. doi: 10.1111/j.1469-185X.1970.tb01076.x.
- Bindas, E.M. (1984). Reproductive and Metabolic Characteristics of Dairy Cattle Supplemented with/Carotene . *J Dairy Sci* 67, 1249-1255.
- Blaner, W.S., Obunike, J.C., Kurlandsky, S.B., Al-Haideri, M., Piantedosi, R., Deckelbaum, R.J, y Goldberg, I.J. (1994). Lipoprotein Lipase Hydrolysis of Retinyl Ester. Vol. 269, No. 24, Issue of June 17, pp.16559-11969546 5,
- Blaner, W.S., O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, N.J., D'Ambrosio, D., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M.C., Piantedosi, R., y Libien, J. (2009). Hepatic Stellate Cell Lipid Droplets: A Specialized Lipid Droplet for Retinoid Storage. *Biochim Biophys Acta.* 1791(6): 467-473.
- Blomhoff, R.B., Green, M.H., Green, J.B., Berg, T. y Norum, K.R. (1991). Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. . *Physiol Rev*, 71, 951-990. .

- Blomhoff, R.B., Berg, T. y Norum, K.R. (1988). Transfer of retinol from parenchymal to stellate cells in liver is mediated by retinol-binding protein. *Cell Biology*, Vol. 85. 3455-3458.
- Boulanger, A., McLemore, P., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Yu, S.S., Gentleman, S, y Redmond, T.M. (2003). Identification of beta-carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.02-0690fje.
- Brossaud, J., Pallet, V., Corcuff, J.B. (2017). Vitamin A, endocrine tissues and hormones: interplay & interactions. *Endocrine Connections Publish Ahead of Print*, 6, R121–R130.
- Bruhn, J.C, y Oliver, J.C. (1978). Effect of Storage on Tocopherol and Carotene Concentrations in Alfalfa Hay. *J Dairy Sci.* 61. 980-982.
- Bustos-Obregon, E., y Torres-Díaz, L. (2012). Seasonal Reproduction in the Male. *Int. J. Morphol.* 30, 1266-1279.
- Calderón-Leyva, G. (2017). Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato: comportamiento sexual y efecto macho (Tesis-Doctoral). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Universidad de Córdoba.
- Cardinault, N., Doreau, M, y Nozière, P. (2004). Devenir des caroténoïdes dans le rumen Fate of carotenoids in the rumen. *N. Renc. Rech. Ruminants*, 11.
- Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M.J., Malkinson, A.M. y Ruch, R.J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* vol.19 no.1 pp.61–67
- Chassard, D., Bur, I., Poirel, V. J., Mendoza, J. y Simonneaux, V. (2015). Evidence for a putative circadian kiss-clock in the hypothalamic AVPV in female mice. *Endocrinology*, 156(8), 2999-3011.
- Chauveau-Duriot, B., Doreau, B., Nozière y Graulet, P.B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine

- plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal Bioanal Chem*, 397, 777-790.
- Chemineau, P., Bodin, L., Migaud, M., Thiery, J.C., Malpaux, B. (2010). Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 42-49.
- Chemineau, P., Daveau, A., Cognie, Y., Aumont, G., Chesneau, D. (2004). Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Neurosci*, 4, 12.
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, C., Pellicer-Rubio, M., Malpaux, B. (2008). Seasonality of Reproduction in Mammals: Intimate Regulatory Mechanisms and Practical Implications. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 40-47.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci.* 30:157-84. doi: 10.1016/0378-4320(92)90010-B.
- Chemineau, P. y Delgadillo, J.A. (1993). Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Rev. Cient, FCV-LUZ.* 3, 113-121.
- Chen, H., Zhao, L., Kumazawa, M., Yamauchi, N., Shigeyoshi, Y., Hashimoto, S. (2013). Downregulation of core clock gene *Bmal1* attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304, C1131-40. Doi: 10.1152/ajpcell.00008.2013
- Chew, B.P. (1993). Effects of supplemental beta-carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J. Anim Sci*, 71: 247-252.
- Chew, B.P. (1995). Antioxidant Vitamins Affect Food Animal Immunity and Health. *J. Nutr.* 125: 1804S-1808S.
- Chew, B.P., Weng, B.B.C., Kim, H.W., Wong, T.S., Park, J.S., Lepine, A.J. (2001). Uptake of β β -carotene by ovarian and uterine tissues and effects on steroidogenesis during the estrous cycle in cats. *Am J Vet Res.* Vol. 62, No. 7: 1063-1067.

- Clarke, J. y Caraty, A. (2013). Kisspeptin and seasonality of reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 784, 411-30.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D. y Blaner, W.S. (2011). Vitamin A Metabolism. *Nutrients*; 3(1), 63-103.
- Dardente, H., Lomet, D., Robert, V., Decourt, C., Beltramo, M. and Pellicer-Rubio, M. (2016). Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, 86(1), pp.324-332.
- De Ondarza, M. (2009). Can beta-carotene help dairy reproduction? *Feedstuffs*, 81, 40.
- De Ondarza, M.B. (1990). Effect of Supplemental β -Carotene on Yield of Milk and Milk Components and on Reproduction of Dairy Cows. *The Professional Animal Scientist*, 25, 510-516.
- De Ondarza, M.B. (2009). Production and Reproduction Responses of Dairy Cows to Supplemental Beta-carotene. *Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop*, 1-9.
- Delgadillo, J. (2010). Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. *Animal*, 5(1), 74-81. doi: 10.1017/s1751731110001400
- Delgadillo, J., Carrillo, E., Morán, J., Duarte, G., Chemineau, P. y Malpoux, B. (2001). Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *J. Anim. Sci.* 79, 2245-2252.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Poindron, P., Keller, M., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P., (2015). Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats, *Hormones and Behavior*, 69, 8-15.
- Deming, D.M. y Erdman Jr, J.W. (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *IUPAC, Pure Appl. Chem.* Vol. 71, no. 12. 2213-2223.
- Demmig-Adams, B.G., Gilmore, A.M, y Adams III, W.W. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *. FASEB J.* 10,, 403-412.

- Duarte, G., Nava-Hernández, M., Malpaux, B, y Delgadillo, J. (2010). Ovulatory activity of female goats adapted to the subtropics is responsive to photoperiod. *Anim Reprod Sci* 120, 65-70.
- Elejalde-Guerra, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *AN. MED. INTERNA (Madrid)* Vol. 18, Nº 6, 326-335.
- Fierce, Y., De Moraes-Vieira, M., Piantedosi, R., Wyss, A., Blaner, W.S, y Paik, J. (2008). In Vitro and In Vivo Characterization of Retinoid Synthesis from β -carotene. *Arch Biochem Biophys*; 472(2), 126–138.
- Frankel, E.N. (1984). Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance. *JAOCS*, Vol. 61, no. 12.
- Fraser, P.D, y Bramley, P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. . *Prog Lipid Res*, 43(3) doi:10.1016/j.plipres.2003.10.002, 228-265.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L, y Panfili, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. . *WT - Food Science and Technology* 43, 867-871.
- Friedman, S.L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev* 88, 125–172.
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M., Guzmán, J. y Zarazaga, L. (2014). Role of body condition score and body weight in the control of seasonal reproduction in Blanca Andaluza goats. *Animal Reproduction Science*, 151(3-4), pp.157-163.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. (1996). Chlorophyll Virgin Olive Varieties and Carotenoid Composition in Oils from Various Spanish Olive. *J Sci Food Agric*, 72, 31-39
- Geerts, A. (2001). History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *SEMINARS IN LIVER DISEASE*/Vol. 21, No 3. 311-337.
- Gong, X., Tsai, S.W., Yan, B, y Rubin, L.P. (2006). Cooperation between MEF2 and PPAR γ in human intestinal β , β -carotene 15,15'-monooxygenase gene expression. . *BMC Molecular Biol* 7, 7.

- Goodman, D.S., Huang, H.S, y Shiratori, T. (1965). Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *Journal of Lipid Research* Vol. 6.
- Goodman, R.L., Ohkura, S., Okamura, H., Coolen, L. M., y Lehman, M.N. (2018). KNDy hypothesis for generation of GnRH pulses: evidence from sheep and goats. *The GnRH Neuron and Its Control*. Hoboken, NJ: Wiley, 289-324.
- Gootwine, E., Pollott, G. (2000). Factors affecting milk production in improved Awassi dairy ewes. *Anim Sci.* 71: 607-15. doi: 10.1017/S1357729800055387.
- Graff, K.J., Meintjes, M., Han, Y., et al. (2000). Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *J Dairy Sci.* 83:484–7. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74907-1.
- Graves-Hoagland, R.L., Hoagland, T.A, y Woody, C.O. (1988). Effect of/B-Carotene and Vitamin A on Progesterone Production by Bovine Luteal Cells . *J Dairy Sci.* 71, 1058-1062.
- Guh, Y., Tamai, T., y Yoshimura, T. (2019). The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(7), 343-357. doi: 10.2183/pjab.95.025.
- Hafez, E.S.E., (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *J Agric Sci* 42, 189-265.
- Haila, K. (1999). Effects of Carotenoids and Carotenoid-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation in Vitro. 1) Scavenging of Free Radicals. 2) Formation and Decomposition of Hydroperoxides. (Diss.). EKT-series 1165. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. , 81.
- Halliwell, B.G. (1995). The definition and measurement of antioxidant in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, I, 125-126.
- Hamann, H., Horstick, A., Wessels, A., Distl, O. (2004). Estimation of genetic parameters for test day milk production, somatic cell score and litter size at birth in East Friesian ewes. *Livest Prod Sci.* 87:153-60. doi: 10.1016/j.livprodsci.2003.09.015.

- Harrison, E.H. (1995). Hepatic uptake and metabolism of chylomicron retinyl esters: probable role of plasma membrane/endosomal retinyl ester hydrolases. *J. Lipid Res.* 36: 1498-1506.
- Helfer, G., Barrett, P. y Morgan, P. (2019). A unifying hypothesis for control of body weight and reproduction in seasonally breeding mammals. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(3), p.e12680.
- Herbison, A.E. (2018). The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology*, 159(11), 3723-3736.
- Herbison, A.E., De Tassigny, X.D., Doran, J., Colledge, W.H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 151:312-21. Doi:10.1210/en.2009-0552 26.
- Hernández., N.T. (2007). Influencia del aporte de carotenoides en la dieta, sobre la pigmentación, composición lipídica corporal y desarrollo de alevines de bocinegro o pargo (*Pagrus pagrus*). Curso 2006/07 Ciencias y tecnologías/31 I.S.B.N., 978-84.
- Hessel, S., Eichinger, A., Isken, A., Amengual, J., Hunzelmann, S., Hoeller, U., Elste, V., Hunziker, W., Goralczyk, R., Oberhauser, V., VonLintig, J. y Wyss, A. (2007). CMO1 Deficiency Abolishes Vitamin A Production from Carotene and Alters Lipid Metabolism in Mice. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, No. 46, 33553-33561.
- Hoffman, G.E., Le, W.W., Franceschini, I., Caraty, A., Advis, J.P. (2011). Expression of Fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology* 152:214–22. Doi:10.1210/en.2010-0066.
- Hötzel, J., Martin, G., y Caraty, A. (1992). Effect of nutrition on testicular growth in rams immunized against GnRH. In: *Proceedings of the Endocrine Society of Australia*, 35, 87.
- Huang, G.Y., Cooper, E.S., Waldo, K., Kirby, M.L., Gilula, N.B. and Lo, C.W. (1998). Gap Junction-mediated Cell-Cell Communication Modulates

- Mouse Neural Crest Migration. *The Journal of Cell Biology*. Volume 143, Number 6., 1725-1734.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M.A., Swaab, D.F., Buijs, R.M. (2010). Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol*. 22: 362-72. Doi:10.1111/j.1365-2826.2010.01956.x
- Karman, B.N., Tischkau, S.A. (2006). Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod*. 75: 624–32. doi: 10.1095/biolreprod.106.050732.
- Kawahsima, C. (2010). Effect of b-Carotene Supply During Close-up Dry Period on the Onset of First Postpartum Luteal Activity in Dairy Cows. *Reprod Dom Anim*, 45, e282-e287.
- Kitahashi, T., y Parhar, I. (2013). Comparative aspects of kisspeptin gene regulation. Review. *General and Comparative Endocrinology* 181, 197-202.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., et al. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-6. Doi:10.1074/jbc.M104847200
- Kriegsfeld, L., Ubuka, T., Bentley, G., & Tsutsui, K. (2015). Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 65-75. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.12.001.
- Latscha T. 1990. Carotenoids-their Nature and Significance in Animal Feeds. F. Hoffmann-La Roche Ltd, Animal Nutrition and Health, Basle, Switzerland.
- Leboeuf, B., Furstoss, V., Guillouet, P., Boue, P. (2004). Production of artificial insemination doses from Alpine and Saanen bucks under various photoperiodic cycles. *S Afr J Anim Sci*. 34, 230-2.
- Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., et al. (1998). Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest Prod Sci*. 1998; 55:193–203. Doi: 10.1016/S0301-6226(98)00140-7.

- Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L., Viguie, C., Billings, H.J., Karsch, F.J., (2002). Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reprod Suppl* 59.
- Leyvaocariz, H., Munro, C., Stabenfeldt, G.H., (1995). Serum LH, FSH, estradiol-17-Beta and progesterone profiles of native and crossbred goats in a tropical semiarid zone of Venezuela during the estrous-cycle. *Anim Reprod Sci.* 1995;39:49–58.
- Ligda, C., Gabrilidis, G., Papadopoulos, T., Georgoudis, A. (2000). Estimation of genetic parameters for production traits of Chios sheep using a multitrait animal model. *Livest Sci.* 66:21-1. Doi: 10.1016/S0301-6226(00)00184-6.
- Lincoln, G., Lincoln, C. y McNeilly, A. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Reproduction*, 88(2), pp.623-633.
- Livingston, A.L., Knowles, R.E., Nelson, J.W. y Kohler, G.O. (1968). Xanthophyll and Carotene Loss during Pilot and Industrial Scale Alfalfa Processing, *J. Agr. Food Chem.* Vol. 16, No. 1, 84-87.
- Lucas, A. (2005). Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese. *Lait* 86 INRA EDP Sciences, 177-202.
- Luo, J., Wang, W. y Sun, S. (2019). Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(8),1284-1295.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G. and Chemineau, P. (1998). Evidence That Melatonin Acts in the Premammillary Hypothalamic Area to Control Reproduction in the Ewe: Presence of Binding Sites and Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion byin SituMicroimplant Delivery1. *Endocrinology*, 139(4), 1508-1516.
- Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H., y Chemineau, P. (2001). "Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin." *J. Biol. Rhythms* 16, 336-47.

- Martin, G., Boukhliq, R., Tjondronegoro, S., Hötzel, J. y Fisher, S. (1992). The effects of nutrition on reproductive endocrinology. In: Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 17, 177-188.
- Martin, G., y Banchemo, G. (1999). Investigación Australiana en Reproducción de Caprinos. Symposium on Goat Reproduction, Colegio de Postgraduados, Programa de Ganadería, Montecillo, México.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davison, R.H., Hunzicker, G.E.B., Lindsay, D.R., Blache, D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 82, 83, 231-45. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.014.
- McDowell, L.R. (2002). Recent Advances in Minerals and Vitamins on Nutrition of Lactating Cows. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1), 8-19.
- Meza-Herrera, C., Vargas-Beltran, F., Vergara-Hernandez, H., Macias-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L. y Rodríguez-Martínez, R. (2013). Betacarotene supplementation increases ovulation rate without an increment in LH secretion in cyclic goats. *Reproductive Biology*, 13(1), 51-57. doi: 10.1016/j.repbio.2013.01.171.
- Morales, J.U., Nieto, C.A.R., Ávila, H.R.V. y Manjarres, E.V.A. (2016). Resumption of ovarian activity is modified by non-photoperiodic environmental cues in Criollo goats in tropical latitudes, *Small Ruminant Research*, 137, 9-16.
- Nagamalleswari, Y., Iyyangar, M.P., Gopinath, S., Raghavender, K.B.P. (2004). Biometrical relationship of ovaries and pituitary during prepubertal period in goat (*Capra hircus*) *Indian J Anim Sci.* 74, 256-8.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M. (2006). Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 131, Issues 3–4, 418-450.
- NRC. (1981). Nutrient Requirements of Goats Angora, Dairy, and Meat in Temperate and Tropical Countries. National Research Council, N° 15, 60.
- NRC. (2007). Nutrient requirements of small ruminants; sheep, goats, cervids, and new world camelids. The National Academies Press, 1-362.

- Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2009). Señalización de kisspeptina en el cerebro. *Endocr Rev* 30, 713-743. Doi: 10.1210 / er.2009-0005.
- Oldham, E.R., Eberhart, R.J., y Muller, L.D. (1990). Effects of Supplemental Vitamin A or B-Carotene During the Dry Period and Early Lactation on Udder Health. *J Dairy Sci*, 3775-3781.
- Oliveira, A.A. (2017). Antioxidant Power of Carotenoids, Flavonoids and Vitamin E in Preventing Arteriosclerosis. *ReonFacema*. 2(4): 320-324.
- Paik, J., During, A., Harrison, E.H., Mendelsohn, C.L., Lai, C. y Blaner, W.S. (2001). Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene: the formation of retinoids. *JBC Papers in Press*. Published as Manuscript M010086200, 1-39.
- Paik, J., Vogel, S., Quadro, L., Piantedosi, R., Gottesman, M., Lai, K., Hamberger, L., De Moraes Vieira, M. y Blaner, W.S. (2004). Vitamin A: Overlapping Delivery Pathways to Tissues from the Circulation. *J. Nutr.* 134, 276S-280S.
- Park, Y.W., Anderson, M.J., Walters, J.L. y Mahoney, A.W. (1983). Effects of Processing Methods and Agronomic Variables on Carotene Contents in Forages and Predicting Carotene in Alfalfa Hay with Near-Infrared-Reflectance Spectroscopy. *J Dairy Sci* 66, 235-245.
- Paul, M.J., Zucker, I., Schwartz, W.J., (2008). Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 363, 1490, 341-361.
- Pelletier, J., Chemineau, P., Delgadillo, J.A. (1988). Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. *Proceedings of 11th International Congress Animal Reproduction Artificial Insemination*, 25-30; Dublin, Ireland, 214-9.
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., et al. (2007). Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim Reprod Sci.*, 98, 241-58. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.002.

- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., et al. (2008). High fertility using artificial insemination during deep anoestrus after induction and synchronization of ovulatory activity by the "male effect" in lactating goats subjected to treatment with artificial long days and progestagens. *Anim Reprod Sci.*, 109, 172-88. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.026.
- Rakes, A.H. (1984). Effects of Adding Beta-Carotene to Rations of Lactating Cows Consuming Different Forages . *J Dairy Sci*, 68, 1732-1737.
- Ramaswamy, S., Seminara, S.B., Ali, B., Ciofi, P., Amin NA et al. (2010) Neurokinin B estimula la liberación de GnRH en el mono macho (Macaca mulatta) y se colocaliza con kisspeptina en el núcleo arqueado . *Endocrinology*, 151, 4494-4503.
- Rosa, H.J.D. y Bryan, M.J. (2002). "The "Ram effect" As a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rum.Res.* 45, 1-16.
- Rosales-Nieto, C.A., Urrutia-Morales J, Gámez-Vázquez H. Díaz-Gomez MO y Ramírez-Andrade, B.M. (2006). "The influence of feeding level on the reproductive activity of mexican native goats during the reproductive season " *Téc.Pec.Méx.* 44, 399-406.
- Ross, A.C. (2004). Implications for Milk Retinoid Content Chylomicron Margination, Lipolysis, and Vitamin A Uptake in the Lactating Rat Mammary Gland: *Exp Biol Med* 229, 46-55.
- Ross, A.C. (2007). Lung Retinyl Ester Is Low in Young Adult Rats Fed a Vitamin A–Deficient Diet after Weaning, despite Neonatal Vitamin A Supplementation and Maintenance of Normal Plasma Retinol. *J. Nutr.* 137, 2213-2218.
- Sakamoto, K., Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Tanaka, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., y Okamura, H. (2013). A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PloS one*, 8, 11, e81017. Doi:10.1371/journal.pone.0081017.
- Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., González-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpaux, B., y López-Sebastián, A. (2005). Differences in reproductive

- pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 416-429.
- Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., Gomez-Brunet, A., Chemineau, P. (2000). Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reprod Nutr Dev.* 40, 421-430.
- Schweigert, F.J. (2003). Research note: changes in the concentration of β -carotene, α -tocopherol and retinol in the bovine corpus luteum during the ovarian cycle. *Arch. Anim. Nut.* 57(4), 307-310.
- Scott, C., Rose, J., Gunn, A. y McGrath, B. (2019). Kisspeptin and the regulation of the reproductive axis in domestic animals. *Journal of Endocrinology*, R1-R16.
- Sellix, M.T. (2015). Circadian clock function in the mammalian ovary. *J Biol Rhythms*, 30, 7-19. Doi:10.1177/0748730414554222.
- Sies, H. (1997.). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291-295.
- Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V.J., Gauer, F. (2013). Kisspeptins and RFRP-3 act in concert to synchronize rodent reproduction with seasons. *Front Neurosci*, 7, 22. Doi:10.3389/fnins.2013.00022
- Simonneaux, V., y Bahougne, T. (2015). A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. *Frontiers in endocrinology*, 6, 157.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., y Steiner, R.A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146 (9), 3686-3692.
- Stahl, W.S., Sies, H. (2005.). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1740, 101–107.
- Teyssier, J., Canepa, S., Chemineau, P., Malpaux, B., Migaud, M., Bodin, L. (2002). Preliminary results on selection lines for spontaneous spring ovulatory activity in merinos d'arles sheep. 7th World Congress on

Genetics Applied to Livestock Production Montpellier 19-23 August, 685-688.

- Thiery, J.C., Lomet, D., Bougoin, S., y Malpaux, B. (2009). "Turnover rate of cerebrospinal fluid in female sheep: Changes related to different light-dark cycles." *Cerebrospinal Fluid Res* 6, 9.
- Thompson, I.R., y Kaiser, U.B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 385, 28-35.
- Trosko, J.E. (2003). The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 36, No. 1, 43-48.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T. D., Mazura, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Van Bennekum, A.M., Kako, Y., Weinstock, P.H., Harrison, E.H., Deckelbaum, R.J., Goldberg, I.J. y Blaner, W.S. (1999). Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J. Lipid. Res.* 40, 565- 574.
- Veliz, F.G., Moreno, S., Duarte, G., Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A. (2002). Male effect in seasonally anovulatory lacting goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 197-207.
- Viguie´ C., Caraty, A., Locatelli, A., Malpaux, B. (1995). Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in GnRH and luteinizing hormone pulsatile secretion. *Biol Reprod*, 52, 1114-1120.
- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V. M., Okamura, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion

- in the goat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30, 3124-3132. Doi:10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B. (1994). Effect of nutrition on seasonal pattern of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian Cashmere goats. *J. Reprod Fertil*, 351-360.
- Wang, Y.J. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture* 261, 641-648.
- Williams, L.M. y Morgan, P.J. (1998). Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* 119, R1-R3.
- Williams, W.P., Jarjisian, S.G., Mikkelsen, J.D., Kriegsfeld, L.J. (2011). Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152, 595-606. Doi:10.1210/en.2010-0943
- Wisse, E.D., De Zancar, R.B., Charles, K., Van Der Smissen, P. y McCuskey, R.S. (1985). The Liver Sieve: Considerations Concerning the Structure and Function of Endothelial Fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse. *Hepatology*. Vol. 5. No. 4, 683-692.
- Wongsiriroj, N., Piantedosi, R., Palczewski, K., Goldberg, I.J., Johnston, T.P., Li, E. y Blaner, W.S. (2008). The Molecular Basis of Retinoid Absorption. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 283, No. 20, 13510-13519.
- Wyss, A. (2001). Expression pattern and localization of β,β -carotene 15,15 α -dioxygenase in different tissues. *Biochem. J.* 354, 521-529.
- Wyss, A. (2004). Carotene Oxygenases: A New Family of Double Bond Cleavage Enzymes. *J. Nutr.* 134, 246S-250S.
- Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database* Vol. 2017: article ID bax004; doi:10.1093/database/bax004, 1-11.

- Yamamura, T., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Navarro, V.M. y Okamura, H. (2015). Efectos de la administración intravenosa de agonistas selectivos de subtipo de receptor de neuroquinina sobre la actividad del generador de pulso de la hormona liberadora de gonadotropina y la secreción de hormona luteinizante en cabras. *El diario de reproducción y desarrollo*, 61, 20-29. Doi: 10.1262 / jrd.2014-109.
- Yeh, S.-L., Hu, M.-L. (2003). Oxidized B-carotene inhibit gap junction intercelular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1677-1684.
- Yoshikawa, T. Sellix M, Pezuk P, Menaker M. (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150, 4338-47. Doi:10.1210/en.2008-1280
- Young, A.J. y Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 1, 20-27.
- Young, A.L. y Lowe, G.M. (2018). Carotenoids antioxidants-properties. *Antioxidants*, 7, 28; doi:10.3390/antiox7020028
- Zaja, I.Z., Vince, S., Milinkovic-Tur, S., *et al.* (2018). Exogenous melatonin influences distribution of French Alpine buck spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations during the non-breeding season. *Anim Reprod Sci.* 192, 154-63. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.003.
- Zarazaga L.A., Gatica M.C., Celi I., Guzmán J.L., y Malpoux B. (2012). Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat females. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 81-87.
- Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Hernandez, H., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., Guzman, J.L. (2019). Photoperiod-treated bucks are equal to melatonin-treated bucks for inducing reproductive behavior and physiological functions via the “male effect” in Mediterranean goats. *Anim Reprod Sci.*, 202:58-64. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.01
- Zhang Antioxidant Properties. *Cancer Research* 52, 5707-5712.

- Zhao, Y., Luo, N., Tan, Q., Zhang, Y. y An, B. (2017). The dynamic expression patterns and correlation of Tet1 and WNT pathway genes in early fetal tissues of goat. *Reprod Domest Anim.*, 52-65.
- , L-X., Cooney, R.V. y Bertram, J.S. (1992). Carotenoids Up-Regulate Connexin43 Gene Expression Independent of Their Provitamin A or