



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
Coordinación de Posgrado**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO SOBRE EL
INICIO DE LA PUBERTAD Y NIVELES SÉRICOS DE INSULINA EN CABRAS**

TESIS

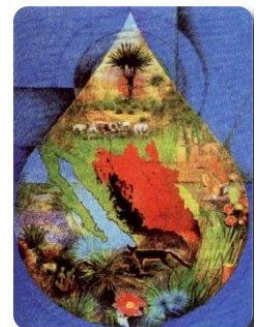
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**

Presenta:

Ing. Luis Carlos Hernández Valenzuela

Bermejillo, Durango, 14 de Mayo, 2010

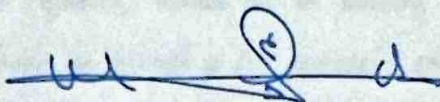


EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BETACAROTENO SOBRE EL INICIO DE LA PUBERTAD Y NIVELES SÉRICOS DE INSULINA EN CABRAS

Tesis realizada por **Luis Carlos Hernández Valenzuela** bajo la dirección del Comité Asesor, aprobada y aceptada como requisito para obtener el grado de:

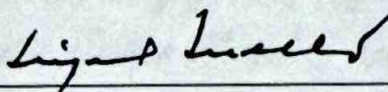
**Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente
en Zonas Áridas**

Director



Ph. D. Cesar A. Meza Herrera
Universidad Autónoma Chapingo URUZA, México.

Asesor



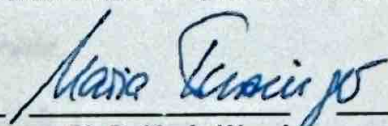
Ph.D. Miguel Mellado Bosque
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.

Asesor



Ph.D. Antonio González-Bulnes
INIA, Departamento de Reproducción Animal, España

Asesor



Ph.D. Maria Wurzi
BOKU-University, Vienna, Austria.

Asesor



Ph. D. Ricardo Tréjo C.
Universidad Autónoma Chapingo URUZA, México.

Asesor



Ph. D. Fermín Jimenez Krassel
Michigan State University East Lansing MI USA.

Dedicatoria

Hoy solo quiero decir gracias a todas aquellas personas que han estado cerca a través de los años. Este trabajo no es solo del tiempo en una institución tan grande como Chapingo, es parte de toda mi vida, desde mi infancia, vivida en mi pueblo, Abasolo Durango, y mis experiencias en los lugares por donde he pasado y las personas con las que he convivido.

A mi familia, lo más grande y valioso que Dios me dio, mi madre y mi padre; mis hermanos, Valentín, Alvaro, Roberto, Jaime, Chuy y Juan; Angélica, Sandra y Stefania. Mis sobrinos Luis Felipe, Ángel Valentín, Jenifer Alexandra, Xochitl y Diana Sofía; que hasta hoy han sido la alegría y parte del motivo mi vida. Que Dios bendiga siempre nuestras vidas y nos mantenga unidos en el amor.

A mi amiga y compañera; mi otra mitad, la dueña de mi vida, mi amante y esposa... Miriam, le doy gracias a Dios por juntar nuestros caminos y le pido que nos ayude a mantenernos cada día unidos en el amor y la comprensión.

Amigos, compañeros con los que he vivido experiencias que nos han marcado en la unidad, Piedad Segovia, Pedro Meza, Sergio Meza, Arturo Segovia, Misael Meza, Jorge Valencia y sus familias... Nacho, Thedy, Alicia, Emiliano, Onan... Jairo, Víctor, Norma y Gerardo, ha sido muy especial contar con personas como ustedes en cada momento.

A todos aquellos que incondicionalmente están ahí, los que han pasado a mi lado y me han enseñado mucho. Gracias a Dios por esta hermosa vida que me ha tocado, esta manera de vivir, me gusta y la amo, por ella vivo...

Luis Carlos Hernández Valenzuela

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo institucional para realizar mi maestría. A mi país México y toda su gente a quienes hacen posible cada día las instituciones de investigación crezcan y apoyen a gente como lo hicieron por mí.

La presente investigación es resultado del apoyo multi-institucional, nacional e internacional, por la UACH-URUZA-Coordinación de Posgrado, UAAAN, INIFAP-CENID-RASPA, INIA-Departamento de Reproducción Animal, España, & BOKU-University, Vienna, Austria. Financiado por los Proyectos de investigación CONACYT-FOMIX-DURANGO: DGO-2008-C01-87559 & DGO-2009-C02-116746, URUZA-UACH-REBIZA No. 09-3000-803, por México y ALFA-III-ALAS, DCI-ALA/A9.09.01/08/ 19189/161-358/ALFA-III-82, por la Unión Europea.

Una gran experiencia que me permitió ir más allá y abrir el horizonte fue la de conocer y ser parte del proyecto MSU-UACH-TIES, dirigido por Luis A. García, Emily Holly y Bernardo López A, y a todo el equipo de trabajo en *Migrant Student Services* de Michigan State University, quienes me permitieron vivir una de las mejores experiencias que hasta el momento he tenido. Al departamento de Animal Science, al Dr. Richard Pursley y Fermín Jiménez, con quienes compartí momentos y experiencias en su laboratorio e instalaciones, Dr. Aijaz Ali Chana, M.Sc. Joan Paulo (JP), Haira, Megan, Jaky, Tracy, Armando Castro, Julio Eli, Juan Cruz, Paty Joly mil gracias por su compañía y apoyo.

Una vez más a todos en el departamento de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo; maestros, administrativos, compañeros y amigos con los que compartí durante este periodo, mil gracias por su apoyo incondicional.



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACION
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA

Antonio González de Bulnes López,

Investigador titular Departamento de Reproducción Animal del INIA
Puerta de Hierro s/n, Madrid España 28040
Tel: 91 347 40 22 FAX: 91 347 40 14

Informa:

Que la memoria de Tesis titulada *Efecto de la suplementación de betacaroteno sobre el inicio de la pubertad y niveles séricos de insulina en cabras* y presentada por *Luis Carlos Hernández Valenzuela* contiene los requerimientos científicos y formales necesarios para su presentación y defensa.

El trabajo señalado es destacable por su originalidad, innovación y esperable impacto científico. El tema es, en sí mismo, extrapolable a otras especies, lo que aumenta su interés para investigadores que desarrollen su trabajo en interacción nutrición-reproducción. Habitualmente, existe una segregación entre ambos aspectos, segregación que no se produce en la presente memoria de Tesis.

En el manuscrito se realiza una adecuada revisión bibliográfica y puesta al día de los conocimientos en el área de conocimiento. Posteriormente, la descripción del trabajo experimental es adecuada y detallada y garantiza la repetibilidad de los protocolos experimentales. Los resultados son interesantes y se encuentran adecuadamente analizados en el apartado de conclusión, lo que genera unas conclusiones sólidas y justificadas.

En Madrid, a 23 de marzo de 2010

Antonio González de Bulnes López



Dr. Maria Wurzinger

Department of Sustainable Agricultural Systems

Division of Livestock Sciences



Vienna, March 20, 2010

Ref: Review of MSc thesis of Luis Carlos Hernández Valenzuela

The MSc thesis of Mr. Hernandez Valenzuela, entitled “Efecto de la suplementación de betacaroteno sobre el inicio de la pubertad y niveles séricos de insulina en cabras” is well written and represents state of the art of scientific work.

This topic is very relevant in goat keeping and the results help to better understand the interaction of animal nutrition and physiological status of the animals.

The student showed in this thesis that he is able to complete a scientific publication, following international standards. He starts with a in-depth literature review on different aspects on beta-carotene such as chemical composition, but also looking at the effect of the substance in animal nutrition and shows the physiological reactions of animals. He limits his overview not only to goats, but extends it also to other livestock species.

This demonstrates that the student has well studied the literature and that he is capable to analyse the literature related to the topic. The objective of the thesis is clearly stated and the materials and methods described are clearly set up in a way that the results can answer the questions set at the beginning of the research.

In the result section the student uses different means of presenting his interesting results (e.g. graphs or tables). Hereby he demonstrates how to best present different findings to the audience. In a separate chapter of the thesis he discusses his findings with other research done in this area of investigation. This is one of the most important parts of the thesis as the student has to prove that he can critically analyse his results and compare them with literature findings.

Finally, clear conclusions are formulated. Overall, the thesis is very well written.

I wish Mr. Hernández Valenzuela all the best for his further career!

Yours sincerely

Maria Wurzinger

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Índice de Graficas.....	ix
Abreviaturas.....	x
Datos biográficos.....	xii
Resumen.....	xiii
Summary.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	6
2.1. Hipótesis.....	6
2.2. Objetivos.....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1. PUBERTAD	7
3.1.1. Mecanismo neuroendocrino de la pubertad	8
3.2. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN LOS PEQUEÑOS RUMIANTES	13
3.2.1. Estacionalidad, actividad gonadal y comportamiento sexual de las cabras	15
3.2.2. Mecanismos neuroendocrinos, ritmo circanual y estacionalidad	16
3.3. MODELO DE RECARGA METABÓLICA Y PUBERTAD	19
3.4. BETACAROTENO.....	22
3.4.1. Nomenclatura, estructura y propiedades químicas.....	22
3.4.2. Ingesta de la vitamina A en las especies animales.....	25
3.4.3. Absorción intestinal de los carotenoides y ésteres de retinilo	27
3.4.4. Metabolismo del retinol en el hígado	30
3.4.5. Transporte de retinol en la sangre	32
3.4.6. Formación de ácido retinoico y retinol en la célula.	35
3.4.7. Oxidación de los retinoles	35

3.4.8.	Catabolismo celular de los retinoides	38
3.4.9.	Receptores celulares del ácido retinoico como factores de transcripción	40
3.5.	FISIOLOGIA DEL ACIDO RETINOICO	41
3.5.1.	Rol del ácido retinoico en el sistema nervioso central	42
3.5.2.	Rol de la vitamina A en la maduración citoplasmática de oocytos	43
3.6.	BETACAROTENO EN ANIMALES.....	45
3.7.	POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS EFECTOS POSITIVOS DE VITAMINA A SOBRE LA MADURACION CITOPLASMÁTICA DE OOCITOS	52
3.7.1.	Betacaroteno como un antioxidante	53
3.7.2.	Retinol regula la expresión de los receptores a gonadotropinas en las células del cumulus y granulosa	53
3.7.3.	Inducción de midkine en el cumulus de las células de la granulosa	54
3.7.4.	Supresión de la síntesis de ciclo oxigenasa por el ácido retinoico en las células del cumulus de la granulosa.	55
3.7.5.	Supresión de la síntesis de óxido nítrico (ON) por el retinol en las células del cumulus de la granulosa y del oocito	57
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.1.	Localización del área experimental, condiciones ambientales, animales y alimentación .	59
4.2.	Diseño de tratamientos	59
4.3.	Muestreo de sangre	60
4.4.	Cuantificación de progesterona en suero, criterio para evaluar la actividad reproductiva	60
4.5.	Cuantificación de insulina	61
4.6.	Análisis estadísticos	61
4.7.	Modelos estadísticos.....	62
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
5.1.	Resultados.....	64
5.2.	Discusión	71
VI.	CONCLUSIONES	79
VII.	LITERATURA CITADA	80

Índice de cuadros

No.	Titulo	Pag
1	Medias de mínimos cuadrados para peso corporal (PV, kg), y condición corporal (CC, unidades) durante junio (1), Julio (2), agosto (3) y septiembre (4) en cabras prepúberes suplementadas con betacaroteno (Beta) o control (Cont) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera	64
2	Medias de mínimos cuadrados para las concentraciones séricas de insulina y el porcentaje de cabras mostrando actividad ovárica (pubertad, % 1) durante el período experimental junio – noviembre, (n=17) suplementadas con betacaroteno (BB) o control (CC) en la Comarca Lagunera	65
3	Interacción entre medias para las concentraciones séricas de insulina (INS) mediante minima diferencia significativa (LSD) de acuerdo al tiempo de muestreo (TIEMPO) durante el período experimental junio – noviembre, en cabras peripúberes (n=17) suplementadas con betacaroteno (BB) y Control (CC) en la Comarca Lagunera	66
4	Correlaciones entre las concentraciones séricas de insulina (INS), el peso corporal (PC) y el Fotoperiodo durante el período experimental Junio – Noviembre, en cabras peripúberes (n=17) suplementadas con Betacaroteno (Beta) o Control (Control) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera	70

Índice de figuras

No	Titulo	Pag
1	Variaciones estacionales en la producción y el precio de leche de cabra en Francia	14
2	Comportamiento reproductivo de las cabras a través del año	15
3	Formulas estructurales del Beta caroteno y sus metabolitos que existen de manera natural	23
4	Metabolismo del retinol en las células del hígado	31
5	Posibles mecanismos fisiológicos y rutas en las cuales el betacaroteno y sus metabolitos pudieran afectar la pubertad	73

Índice de Graficas

No.	Titulo	Pag
1	Concentraciones séricas de Insulina atravez del tiempo de muestreo para el grupo Control (CONT) y Beta caroteno (BETA) durante el periodo experimental	67
2	Fotoperiodo anual en la región de Bermejillo Durango. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo 26° LN, 103° LO (1,117 msnm)	68
3	Concentraciones séricas de insulina, fotoperiodo anual para el grupo Control (CONT) y Beta caroteno (BETA) durante el periodo experimental el periodo experimental	69

Abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANNRC	Animal nutrition national research council
AR	Ácido retinoico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BC	Betacaroteno
BETA	Grupo tratado con betacaroteno
bFGF	Factor básico de crecimiento del fibroblasto
CC	Condición corporal
CONT	Grupo control
COX	Ciclo oxigenasa
CRABP-I	Enzima enlazadora de ácido retinoico celular tipo 1
CRBP-II	Proteínas enlazadoras de retinol tipo II
CYP26A1	enzima P450 citocromo
EE	Error estándar
ENm	Energía neta para mantenimiento
eONS	Oxido nítrico sintetasa endotelial
FSH	Hormona folículo estimulante
FSH-R	Receptores de hormona folículo estimulante
GABA	Ácido amino butírico
GluR5	Receptor a glucosa tipo 5
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GPR54	Proteína G activadora del gen 54
HHG	Hipotálamo-hipófisis-gonadal
HPG	Eje hipotálamo pituitaria gónadas
IA	Inseminación artificial
IGF	Factores de crecimiento análogos a insulina
IGF-I	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I
iONS	Oxido nítrico sintetasa inducida
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
LN	Latitud norte
LO	Longitud oeste
LRAT	Enzima lecitina retinol-acil tranferasa
MK	Midkine
Msnm	Metros sobre el nivel medio del mar
NMDA	N-metil D-aspartato

NMDAR1	Receptor 1 de N-Metil D-Aspartato
nONS	Oxido Nítrico Sintetasa neural
NRC	Nutritional Research Council
NSO	Nivel de significancia observado
O2	Oxígeno
ON	Oxido nítrico
ONS	Oxido nítrico sintetasa
PC	Proteína cruda
PG	Prostaglandinas
PGE2α	Prostaglandinas E _{2α}
PGF2α	Prostaglandina F _{2α}
PI3K/Akt	proteínas quinasas tipo 3
PV	Peso Vivo
RALDH1	Retinol Deshidrogenasa tipo 1
RAR	receptores a ácido retinoico
RARE	Elementos responsivo a los receptores de retinol
RE	Equivalentes de retinol
ROS	Radicales libres de oxígeno
T3	Triyodotironina
T4	Hormona de la tiroides
TGFα	Factor de crecimiento y transformación alfa
TGF-β1	Factor de crecimiento transformador beta-1
TTNN	Acido-tetrahydro-tetrametil-binaftalene-carboxilico (tetracíclico).
TTR	Transtiretina
TTR	Transtiretina
UI	Unidades Internacionales
VLDL	Lipoproteínas de baja densidad

Datos biográficos

El autor de la presente publicación es Ingeniero Agrónomo especialista en Sistemas pecuarios de zonas áridas. Luis Carlos Hernández Valenzuela, nacido en Abasolo Durango y graduado de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) de la Universidad Autónoma Chapingo (Uach) en la generación 2001-2006 con el trabajo de tesis *Efecto de la Suplementación de betacaroteno y niveles séricos de Insulina en cabras bajo fotoperiodos crecientes en la comarca lagunera*.

De 2008 y 2009 realizó sus estudios de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente de Zonas Áridas, periodo durante el cual participó como asistente en el proyecto de investigación Aminoácidos excitadores, fotoperiodos decrecientes y suplementación de betacaroteno en cabras: cuantificación de progesterona como marcador endocrino de la pubertad, bajo la dirección del Dr. Cesar A. Meza Herrera y Financiado por los Proyectos de investigación CONACYT-FOMIX-DURANGO: DGO-2008-C01-87559 & DGO-2009-C02-116746, URUZA-UACH-REBIZA No. 09-3000-803, por México y ALFA-III-ALAS, DCI-ALA/A9.09.01/08/ 19189/161-358/ALFA-III-82, por la Unión Europea.

En este periodo publicó dos artículos en revistas nacionales:

- 1) Simulación hidrológica de la parte alta de la cuenca del río Nazas. Relación Agua-Suelo-Planta. AGROFAZ Vol. 8 núm. 3, 2008.
- 2) Suplementación exógena de betacaroteno, pubertad y niveles séricos de insulina en cabras. V Reunión Nacional REVIZA, Octubre 2009. Revista Chapingo serie Zonas Áridas. Vol. 8, Núm. 3
Por otro lado participó en el proyecto TIES-MSU-UACH en el cual realizó dos periodos de estancia en Michigan State University, USA (Jul-Ago 2008 y Ago-Dic 2009) donde se participó en dos Proyectos de investigación:
 - a) Ultrasonic monitoring of follicles and corpora lutea during synchronization with CIDR in heifers and dairy cows and their subsequent superovulatory response. Beef Cattle Research Center MSU. East Lansing MI. Encabezado por el Dr. Richard Pursley (USA) y el Dr. Aijaz Ali Channa (Pakistán).
 - b) Ovulation synchronization strategies in dairy cattle using PGF_{2α} and GnRH for improve the fertility rates in Dairy farms. Middleton and RB Ridge Dairy Farms Michigan USA. Dr. Richard Pursley & Dr. Fermín Jiménez K. (México)

Actualmente labora en PROFAUNA (Protección de la Fauna Mexicana AC) en el proyecto Fortalecimiento del Área de Protección de Flora y Fauna, Cuatrociénegas Coah., en el manejo, conservación y monitoreo de humedales y el pastizal local.

Resumen

El inicio de la pubertad es el resultado de una serie de eventos complejos que ocurren en el eje neuroendocrino reproductivo iniciado por la liberación de GnRH. Las deficiencias en estado nutricional reducen la condición y el peso corporal, retardando el crecimiento, y por tanto, el inicio de la pubertad. En rumiantes, la suplementación con betacaroteno incrementa tanto la fertilidad como la viabilidad del embrión. La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de la suplementación de betacaroteno sobre el inicio de la pubertad y la secreción de insulina en cabras. El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH, Bermejillo, Durango (26 °LN, 103° LO, 1,117 m de altitud), de junio a noviembre. Se utilizaron cabras en crecimiento (n=17, 3 meses de edad, ¾ Saanen-Alpino ¼ Criollo), en dos grupos: 1). Betacaroteno (BB, n=9, PC=17.3±0.97 kg, CC=3.3±0.1), y 2).Control, (CC, n=8; PC=16.1±1.0 kg, CC=3.2±0.1). Las cabras BB recibieron suplementación de 200 mg de betacaroteno por día durante todo el período experimental. Se realizó un muestreo sanguíneo intermitente una vez por semana al total de las cabras en estudio, para cuantificar los niveles séricos de progesterona (P4) e insulina (INS). Tanto el porcentaje de cabras mostrando actividad reproductiva (pubertad) así como el momento del inicio de la actividad ovárica no difirió (P>0.05) entre tratamientos. Sin embargo, se observó un efecto de la suplementación de betacaroteno sobre los niveles séricos de INS al final del período experimental sugiriendo un efecto del betacaroteno sobre la secreción de insulina.

Palabras clave. Cabras, pubertad, progesterona, suplementación de betacaroteno, insulina.

Summary

The onset of puberty is the result of a series of complex events occurring through the neuroendocrine-reproductive axis, where an increase in the pulsatile release of GnRH occurs prior to puberty. A low nutritional level leads to a reduction in both body condition and live weight, generating growth retardation as well as delay in the onset of puberty. In ruminants, betacarotene supplementation increases both fertility and embryo viability. The aim of this study was to evaluate the effect of betacarotene supplementation on the onset of puberty in goats and its possible relation to the serum levels of insulin. The study was carried out in the Southern Goat Research Unit, URUZA-UACH, Bermejillo, Durango (26 °NL, 103° WL, 1,117 m) from June to November. Peripuberal goats (n=17, 3-mo-old, ¾ Saanen-Alpino ¼ Criollo) were used, in two groups: 1) Betacarotene (BB, n=9 BW=17.29±0.97 kg, BCS=3.34±0.12), and 2) Control (CC, n=8; BW=16.13±1.04 kg, BCS=3.17±0.12). The BB treated-goats received a daily supplementation of 200 mg of betacarotene during the whole experimental period. An intermittent blood sampling was performed once weekly to all goats, in order to quantify both serum progesterone (P4) and insulin (INS) levels. Both, percentage and onset of reproductive activity (puberty) did not differ (P>0.05) between treatments. Nonetheless, an increase in serum insulin during the last third of the experimental period was observed in goats supplemented with betacarotene. Such results suggest that betacarotene supplementation in goats generated a positive effect on the release pattern of serum insulin.

Key words: Goats, puberty, progesterone, betacarotene supplementation, insulin

I. INTRODUCCIÓN

El betacaroteno es un compuesto biológico natural caracterizado por un gran rango de funciones biológicas derivadas parcialmente de su estructura, que consiste de ocho unidades isoprenoides asociadas con sus doble enlaces poli insaturados y que son esenciales para el metabolismo de plantas y animales (Rodríguez, 1999). Estas facetas son derivadas de la capacidad del betacaroteno para la isomeración, la captación de oxígenos libres, y la transferencia de electrones durante las reacciones de oxidación y reducción. El betacaroteno produce retinal, vitamina A (retinol) y ácido retinoico (AR). Estos metabolitos derivados del betacaroteno ejercen múltiples efectos fisiológicos mediante la activación de los receptores a ácido retinoico (RAR), miembros de la familia de receptores nucleares a hormonas esteroidales. El AR es el más potente y establecido enlazador de RAR (Pierre *et al.*, 2006), mientras que el retinol juega un importante papel en la regulación de la apoptosis y supervivencia en células neurales (Upadhyaya *et al.*, 2007).

En células del neuroblastoma, el AR induce la transcripción del gen antiapoptótico e incrementa la resistencia a la muerte celular inducida por algunas sustancias. Por otro lado, AR activa, mediante la acción extra genómica, la vía de señalización de las proteínas quinasas tipo 3 (PI3K/Akt), la cual está involucrada en la regulación de la supervivencia celular. En el mismo sentido, la activación de la vía de señalización PIK3/Akt inducida por el AR también contribuye a

regular la transcripción de genes cruciales para la diferenciación celular. La regulación coordinada de la diferenciación y supervivencia celular por el AR puede tener importancia en el contexto de generación celular neural, en el cual un exceso de células precursoras son producidas para asegurar que todas las conexiones nerviosas requeridas se lleven a cabo (Gracia, 2002). Recientemente se encontró un efecto de AR sobre las células germinales de ratones en desarrollo, al incrementar el proceso mitótico, lo cual indica que este proceso pudiera regular la progresión mitótica durante la pubertad (Bowles y Koopman, 2007).

La suplementación con betacaroteno aumenta la fertilidad en el ganado lechero sometido a estrés calórico (Arechiga *et al.*, 1998). La implementación de programas de inseminación durante la temporada de calor incrementa el porcentaje de vacas preñadas, cuando éstas recibieron tratamiento con betacaroteno, observándose un incremento paralelo en la producción de leche. El uso del betacaroteno puede ser una alternativa para mejorar la calidad embrionaria de vacas en superovulación. De acuerdo con Jeans y Gudas (1995), el ácido retinoico juega un importante rol en el desarrollo temprano del embrión y la generación de algunos órganos y sistemas, como el sistema nervioso. En condiciones in-vitro, RA también desempeña un papel prominente en la regulación de la transición y proliferación de células precursoras para la diferenciación celular postmitótica. Sales *et al.*, (2008) observaron efectos benéficos del betacaroteno sobre la calidad embrionaria de vacas, sugiriendo las siguientes reacciones: 1) Un incremento en la síntesis de progesterona a través del rol estimulante de la vitamina A sobre la enzima desdobladora del

colesterol (Weng *et al.*, 2000), 2) Un incremento en la secreción intrauterina de factores importantes asociados a el desarrollo inicial del embrión (Harney *et al.*, 1990), y 3) formación de uniones gap (Stahl *et al.*, 1997) que pueden ser importantes para coordinar la función celular lútea. Un cambio substancial sobre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) puede impactar significativamente el desarrollo del embrión. Por lo anterior, es importante reconocer la necesidad de un apropiado balance entre la cantidad de agentes oxidantes y la capacidad de mecanismos antioxidantes para reducir este efecto. Este balance puede ser obtenido mediante la suplementación de antioxidantes exógenos como el betacaroteno (Sales *et al.*, 2008).

Por su parte, Kawashima *et al.*, (2008) demostraron que cambios en las concentraciones de betacaroteno durante el período periparto difieren entre vacas con actividad ovárica y anovulatorias en la primera oleada folicular postparto, reportando que las concentraciones de betacaroteno decrecen entre la tercer semana preparto y la primera posparto en vacas ovulando, confirmando previos estudios en los cuales la concentración de betacaroteno decreció durante el periodo seco y se restablecieron después de la primera semana posparto (Calderón *et al.*, 2007).

Los principales avances en las últimas décadas para entender el inicio de la pubertad incluyen el descubrimiento de que las neuronas GnRH-I se desarrollan en la placa olfatoria y migran hacia el cerebro. El inicio de la pubertad incluye la secreción de GnRH, la identificación de las señales metabólicas periféricas y la identificación del receptor GPR54 como elementos clave en la vía de

señalización hacia las neuronas GnRH (Francis, 2005). El control central del sistema neuronal GnRH no es ejecutado únicamente por señales transinápticas, sino que intervienen factores provenientes de células gliales. Este conjunto de señales reguladoras se encuentran bajo control de diversos factores de transcripción. De esta forma, se ha propuesto recientemente una aproximación holística, relacionada con la biología de sistemas, para lograr un análisis integral de los mecanismos desencadenantes de la pubertad, dirigida a identificar circuitos de señales, más que factores individuales amplificados en este proceso (Meza-Herrera *et al.*, 2010a,b).

En efecto, la activación del eje gonadotrópico en la pubertad está condicionado por factores endógenos ambientales, especialmente relevante es el papel del estado energético del organismo en el control funcional del eje reproductor a lo largo del desarrollo puberal (Ojeda, 2006). Desde una perspectiva neurobiológica (Francis, 2005), el inicio de la pubertad no es una simple función cronológica determinada por la edad (Francis, 2005; Meza-Herrera *et al.*, 2010a). Así mismo, el sistema de neurotransmisores y neuromoduladores que impacta sobre la red secretora de GnRH, transmite información en relación a la disposición de combustibles metabólicos, almacenamiento de energía y desarrollo somático, y además, en muchas especies detecta la información ambiental respecto al entorno social de acuerdo a la estación del año (Meza-Herrera *et al.*, 2010b).

La activación peri puberal del eje reproductivo es desencadenado por un incremento progresivo en la actividad neurosecretora del sistema neuronal hipotalámico GnRH. Las neuronas que emplean

aminoácidos estimuladores e inhibidores, y el neuropéptido kisspeptina, son los principales responsables de la regulación transináptica de la pubertad (Meza-Herrera *et al.*, 2010a). Algunos de los principales neurotransmisores y nonapéptidos responsables del control sináptico de la neurona GnRH y su activación durante la pubertad, incluyen, entre otros, el glutamato, el ácido γ -aminobutírico (GABA), los péptidos opioides y el neuropeptido Y (Richter *et al.*, 2001; Meza-Herrera *et al.*, 2010 a,b).

No existen evidencias que demuestren el funcionamiento directo del betacaroteno sobre la pubertad, sin embargo, los estudios encaminados a explicar el efecto de este componente metabólico sobre el eje reproductivo sugieren un rol potencial de dicha molécula sobre el inicio de la pubertad a través de sus múltiples funciones, ya sea como una fuente de señalización hormonal o metabólica, que coadyuve a la activación de las neuronas de GnRH, como un potencializador directo de la secreción de progesterona (Weng *et al.*, 2000), así como mediante su función de factor anti-apoptótico que ayude a la activación del eje neural a nivel del hipotálamo, además de su acción como potente antioxidante eliminador de radicales libres dañinos al sistema neural. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la suplementación de betacaroteno sobre el inicio de la pubertad mediante la cuantificación de la concentración sérica de progesterona como marcador endocrino del inicio de la actividad ovárica en cabras prepúberes, durante un período de 148 días (junio –noviembre) en la Comarca Lagunera.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La suplementación de largo plazo de betacaroteno adelanta la pubertad, y tal escenario está positivamente relacionado a altos niveles séricos de insulina.

2.2. Objetivos

Evaluar el efecto de la suplementación de betacaroteno sobre el inicio de la pubertad en cabras

Evaluar el efecto de la suplementación de betacaroteno sobre los niveles séricos de insulina, como un indicador metabólico asociado al inicio de la actividad reproductiva de la cabra durante la pubertad.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. PUBERTAD

La pubertad se define como el período de transición entre la etapa infantil y la adulta en el que se adquiere la capacidad reproductora y tiene lugar la maduración de los órganos genitales y el desarrollo completo de los caracteres sexuales secundarios, además de importantes cambios somáticos y de conducta (Grumbach, 2005). Este conjunto orquestado de cambios endocrinos y físicos está determinado por una gran variedad de factores, desde genéticos hasta ambientales, cuya interacción dinámica es la responsable de la cronología de la pubertad y de sus posibles alteraciones; pubertad precoz, retrasada o ausente (Meza-Herrera *et al.*, 2010 a, b).

La extraordinaria importancia de este proceso madurativo, la fisiología y fisiopatología de la pubertad han sido objeto de estudio pormenorizado, empleando para ello diversas aproximaciones experimentales y especies modelo (Grumbach, 2005; Ojeda y Urbanski, 2005). Desde un punto de vista neuroendocrino, la pubertad está caracterizada por la activación completa del denominado eje gonadotrófico o hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), en este eje neuroendocrino, el decapeptido de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), sintetizado por un número reducido y relativamente disperso de neuronas hipotalámicas, juega un papel jerárquico clave, siendo el principal estímulo fisiológico de la síntesis y liberación de las gonadotrofinas hipofisarias,

LH, hormona luteinizante y FSH, hormona folículo-estimulante, éstas, a su vez, operan sobre receptores específicos a nivel gonadal, siendo los principales reguladores hormonales tanto de la generación de gametos maduros (gametogénesis) a partir de la pubertad, como de la secreción de esteroides y otras hormonas gonadales (Tena-Sempere y Huhtaniemi, 2003; Meza-Herrera *et al.*, 2010 a,b). El control dinámico de este eje neuro-hormonal se apoya en las acciones de retroalimentación negativas y positivas de las señales hormonales procedentes de las gónadas, así como de la acción reguladora de factores adicionales, tanto centrales como periféricos, que actúan primariamente sobre el sistema GnRH hipotalámico.

3.1.1. Mecanismo neuroendocrino de la pubertad

De acuerdo a la organización jerárquica del eje gonadotrófico, la activación peripuberal del eje reproductor es desencadenada por un incremento progresivo de la actividad neurosecretora del sistema neuronal hipotalámico GnRH. Con base en el modelo globalmente aceptado, la neurona GnRH operara como integrador dinámico de una gran diversidad de señales reguladoras (estimatorias o inhibitorias) y efector último de las acciones de las mismas en términos de control de la secreción de gonadotrofinas. A pesar del consenso generalizado en este punto, durante las últimas décadas se han formulado diversas hipótesis acerca de los mecanismos neuroendocrinos responsables del desencadenamiento de la pubertad en mamíferos; hipótesis que han hecho énfasis, entre otros, en modificaciones en la sensibilidad a las acciones de retroalimentación de los esteroides gonadales o cambios en el balance entre señales centrales excitatorias e

inhibitorias que proyectan sobre las neuronas GnRH (Neill, 2006; Grumbach, 2005; Richter y Terasawa, 2001).

En relación con las señales centrales, numerosos estudios recientes han permitido identificar algunos de los principales neurotransmisores y neuropéptidos responsables del control sináptico de las neuronas GnRH y de su activación durante la pubertad, que incluyen el glutamato, la noradrenalina, el ácido amino butírico (GABA), los péptidos opioides y el neuropéptido Y (Grumbach, 2005; Richter y Terasawa 2001). Es destacable que algunos de estos factores llevan a cabo acciones predominantemente inhibitorias sobre el sistema GnRH, tales como GABA y opioides, por lo que la activación puberal de este sistema es definida por modificaciones en el equilibrio entre señales centrales excitatorias e inhibitorias. Así, la quiescencia funcional del eje reproductor durante el período infantil se debe a una inhibición central del sistema GnRH, que daría paso a un predominio progresivo de los circuitos excitatorios durante el período peripuberal. Por otra parte, en años recientes, ha quedado de manifiesto que el control central del sistema neuronal GnRH no es llevado a cabo únicamente por señales trans-sinápticas, procedentes de otras neuronas, sino que en él intervienen igualmente factores procedentes de células de la glía (Ojeda *et al.*, 2000). Este conjunto de señales reguladoras, de origen neuronal y glía, se encuentra bajo el control de diversos factores de transcripción, cuya expresión está igualmente regulada de forma precisa a lo largo del desarrollo puberal. Ojeda *et al.*, (2000) han propuesto recientemente una aproximación holística, relacionada con la biología de sistemas, para el análisis integral de los

mecanismos desencadenantes de la pubertad, dirigida a identificar circuitos de señales, más que factores individuales implicados en este proceso.

Por otra parte, además de las señales centrales, la activación del eje gonadotrópico en la pubertad está condicionada por un número considerable de factores tanto endógenos (periféricos) como ambientales. De entre éstos, es especialmente relevante el papel del estado energético del organismo, y en concreto de la hormona leptina, en el control funcional del eje reproductor a lo largo del desarrollo puberal (Casanueva *et al.*, 1999). La leptina es una hormona secretada por los adipocitos que “informa” a los centros de control de la reproducción del estado de los depósitos grasos del organismo, siendo necesarios unos niveles mínimos de leptina circulante, como índice de una masa grasa crítica, para que se produzca un desarrollo puberal adecuado.

Otras hormonas implicadas primariamente en el control del balance energético, tales como la Grehlina, podrían “cooperar” con la leptina en la integración funcional de los ejes reproductor, del crecimiento y metabólico durante el período puberal (Fernández-Fernández *et al.*, 2006). Adicionalmente, la pubertad es sensible a la acción de diversos moduladores ambientales que incluyen desde cambios en los ciclos luz-oscuridad a la acción de compuestos químicos con actividad hormonal (Parent *et al.*, 2007). En este contexto, se considera que la pubertad es el resultado final de la interacción dinámica entre factores genéticos relevantes y una serie amplia de reguladores tanto endógenos como exógenos; interacción que determinaría en cada individuo la cronología (normal o patológica) del desarrollo puberal (Tena-Sempere, 2007; Meza-Herrera *et al.*, 2010 a,b).

Para que se inicie la pubertad en los mamíferos, se requiere un aumento de la secreción pulsátil de GnRH del hipotálamo. Este cambio tiene un ritmo circadiano, y lleva a la adenohipófisis a producir más gonadotropinas, que también se secretan de manera circadiana (Ojeda y Terasawa, 2002). El aumento de secreción de GnRH, a su vez, viene determinado por un sistema regulador que recibe señales transinápticas y gliales, que modifican la función de las neuronas GnRH. Las señales transinápticas pueden ser tanto estimuladoras como inhibitoras. Las primeras son dadas por aminoácidos estimuladores (Neill, 2006; Ojeda y Terasawa, 2002), el ácido G-aminobutírico, (GABA) y el neuropéptido metastina/kisspeptina, recientemente identificado. Las señales inhibitoras son principalmente el GABA, actuando sobre las redes neuronales conectadas a las neuronas GnRH, y péptidos opioides (Terasawa y Fernández, 2001). Además de esta regulación transináptica, la secreción de GnRH se favorece por señales moleculares intercelulares de origen glía. Entre estas moléculas destacan los factores de crecimiento que actúan vía receptores serina trionina kinasa, como el factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF- β 1), el IGF-I (factor de crecimiento análogo a insulina tipo I), el factor básico de crecimiento del fibroblasto (bFGF), y los miembros de la familia de los factores de crecimiento epidérmicos, el TGF α (factor de crecimiento y transformación alfa), y las neuroregulinas (Ojeda *et al.*, 2003.)

La importancia fisiológica de la transmisión glutamatérgica en el inicio de la pubertad ha sido demostrada en numerosos estudios relacionados con la fisiología de la reproducción, y en específico la determinación del momento del inicio de la pubertad. De acuerdo con Urbanski y Ojeda (1990), la activación de los receptores NMDA (N-metil D-aspartato) mediante la

administración de éste, aumenta la secreción de GnRH y adelanta la pubertad tanto en ratas como en monos. A su vez, el bloqueo de estos receptores por un antagonista no competitivo, retrasa la pubertad en ratas. Otros estudios han demostrado un aumento de la actividad de los receptores NMDA hipotalámicos en el comienzo de la pubertad, y que esta activación no depende de las gónadas (Bourguignon *et al.*, 1992). Se ha demostrado un aumento en el número de neuronas GnRH que expresan receptores a NMDA, en relación con la pubertad. Gore *et al.*, (1996) han demostrado que un número importante (80%) de neuronas GnRH del área preóptica de ratas adultas expresan el ARNm que codifica la subunidad del receptor NMDAR1.

Las neuronas glutamatérgicas también utilizan receptores kainato en la regulación de la secreción de GnRH (Donoso *et al.*, 1990). Durante el desarrollo prepuberal de la rata hembra, cerca del 50% de las neuronas GnRH expresan el ARNm codificante del receptor glutamato kainato (Eyigor *et al.*, 1979). Las neuronas GnRH también expresan ARNm del GluR5, que codifica una subunidad del receptor necesaria para el ensamblaje heterodimérico de canales de kainato de alta afinidad. La importancia de la neurotransmisión glutamatérgica en la regulación estimuladora para el comienzo de la pubertad, queda demostrada por el hecho de que el bloqueo de la síntesis endógena de glutamato en el hipotálamo de la rata durante el desarrollo embrionario, induce una pérdida de la pulsatilidad de GnRH (Bourguignon, 1995).

Sorprendentemente, a pesar de los hallazgos mencionados, según Shimshek (2006), las ratas carentes de receptores NMDA o de la subunidad B esencial del receptor AMPA en neuronas GnRH y otras neuronas del sistema límbico, son fértiles. Estudios sobre el inicio de la pubertad

indican que los principales factores que lo afectan son el peso corporal y la tasa de crecimiento, más que la edad (Joubert, 1963; McDonald, 1980; Mancio *et al.*, 1982). Del mismo modo, Fasanya *et al.*, (1992) determinó que en las cabras el inicio de la pubertad es más influenciada por el nivel nutricional de la dieta, sin ningún efecto en los cambios de ganancia de peso.

De acuerdo con Malau-Aduli *et al.*, (2005), cuando se evalúa el efecto de la dieta, el inicio de la pubertad se presenta en un promedio de 201 días de edad, sin embargo, señala la importancia de la disponibilidad y calidad de alimento durante la etapa previa, por ser la principal determinante de la ganancia de peso, con lo cual confirma que la más importante variable en el inicio de la pubertad es el peso corporal.

3.2. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN LOS PEQUEÑOS RUMIANTES

Los animales de interés zootécnico presentan variaciones en sus genes para productividad, lo cual impacta la disponibilidad de productos derivados de los animales como leche, carne y sus derivados, o para el mejoramiento genético. Esto debido principalmente a la marcada estacionalidad en los nacimientos en ovejas y cabras en latitudes por encima de los 30° N. La mayoría de los animales en zonas templadas muestran variación estacional en su ciclo reproductivo, las frecuencias de ovulación, actividad espermatogénica, calidad de los gametos y además comportamiento sexual. El mecanismo interno involucrado en esta compleja combinación de ritmos endógenos circa-anales es regulado por el fotoperiodo y la hormona melatonina. Algunas de las técnicas usadas para abatir o eliminar esta estacionalidad en pequeños rumiantes provocada por el fotoperiodo, incluyen el uso de cámaras iluminadas artificialmente e inyecciones

de melatonina. Actualmente se recomiendan otras alternativas, como la suplementación alimenticia, afectando directamente el estatus energético del animal y la selección genética.

En climas cálidos, la cantidad de corderos, cabritos y leche varía significativamente durante el año generando altas variaciones en el precio que se paga al productor ocasionado por esta relación oferta-demanda, así como por la capacidad de la industria para procesar estos productos y ofrecerlos al mercado popular (Chemineau *et al.*, 2008). En Francia, la producción de leche de cabra es altamente estacional, en mayo las producciones alcanzan arriba de 30 millones de litros mientras que en noviembre no sobrepasa los 10 millones (figura 1) similarmente, la producción mensual de cabrito es baja en octubre y muy alta en abril, ocasionando cambios muy divergentes en el precio de mercado (Chemineau *et al.*, 2008).

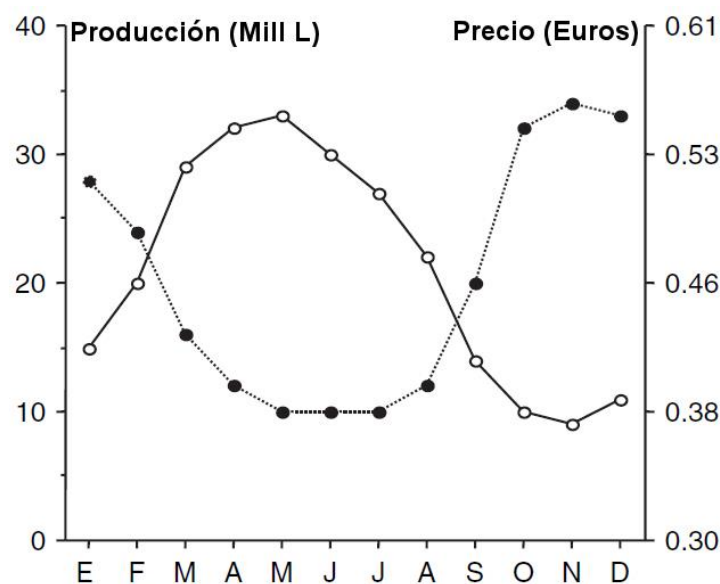


Figura 1 Variaciones estacionales en la producción y precio de leche de cabra en Francia

La estacionalidad en la oferta de productos de origen animal, especialmente cabras y ovejas, es el resultado de factores intrínsecos basados en los mecanismos fisiológicos de adaptación a condiciones ambientales. En el caso de las cabras, el fin del invierno e inicio de la primavera es el periodo más favorable para la sobrevivencia de la progenie, lo que demuestra uno de los factores evolutivos de las especies (fig. 2)

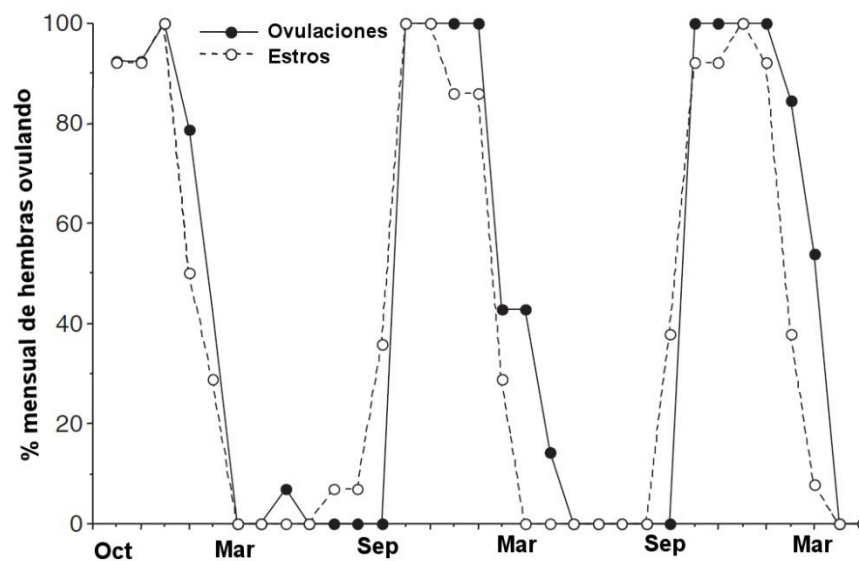


Figura 2 Comportamiento reproductivo de las cabras a través del año.

3.2.1. Estacionalidad, actividad gonadal y comportamiento sexual de las cabras

En latitudes mayores de 30° al norte, la frecuencia de ovulaciones y el comportamiento reproductivo en las cabras lecheras Alpina y Saanen, presentan un largo periodo de inactividad sexual o anestro estacional, variando dramáticamente de los meses de marzo a septiembre, aun cuando se mantenga una buena condición corporal, reiniciando la actividad sexual durante los meses de octubre a enero (Chemineau *et al.*, 1992). Sin embargo, al momento del parto, el

estatus nutricional y el fotoperíodo, especialmente en invierno, actúa sinérgicamente para inducir un patrón estacional de la actividad ovulatoria posparto, caracterizada por un corto periodo de anestro posparto (Ingrand *et al.*, 2003; Agabriel *et al.*, 2004)

Los machos Alpinos también demuestran dramáticas variaciones en su comportamiento sexual, en los meses de inactividad sexual y no presentan montas además de que las diferencias en la fertilidad van desde un 20 hasta un 70 % entre los periodos de primavera- verano y otoño-invierno (Delgadillo *et al.*, 1992).

Las razas originarias de los trópicos y subtropicos presentan menor sensibilidad al efecto del fotoperiodo a través del año, ya que al no haber marcadas diferencias en los ciclos luz-obscuridad, en su mayoría no presentan etapa anovulatoria (Arroyo *et al.*, 2007). Este es una de las más importantes características de este tipo de razas y permiten organizar los cruzamientos de los rebaños de manera que coincidan con el periodo de mayor fertilidad, sin utilizar tratamientos hormonales que en su mayoría representa una fuerte inversión.

3.2.2. Mecanismos neuroendocrinos, ritmo circanual y estacionalidad

Numerosos experimentos se han practicado, principalmente en ovejas, para identificar cuáles son los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la estacionalidad de la reproducción. Un espontáneo cambio estacional en la retroalimentación negativa sobre los esteroides gonadales fue identificado como uno de los primeros elementos clave del sistema (Pelletier y Ortavant, 1975). El núcleo dopaminérgico A15 (DA) del hipotálamo retroquiasmático es probablemente un lugar clave (Thiery *et al.*, 1989, 1995), ya que es el intermediario entre las células enlazadoras a

estradiol y las neuronas liberadoras de LH del área preóptica. Algo interesante acerca de estas células es que están localizadas en dos sitios importantes, la parte propia retroquiasmática del hipotálamo (Gallegos Sánchez *et al.*, 1997) y el área ventral preóptica (Anderson *et al.*, 2001).

En ovejas, la hormona de la tiroides (T4) es requerida constantemente a bajos niveles (Billings *et al.*, 2002) y probablemente actúe en el área premamilaria del hipotálamo posterior. Una variabilidad estacional, identificada por los cambios en la PSA-NCAM, ha sido demostrada en las neuronas LHRH (Lehman *et al.*, 2002). De la misma manera, cambios en la expresión y capacidad de enlace del receptor serotoninérgico 5HT_{2A} fueron observadas en asociación con la pulsatilidad y actividad de LHRH (Chemineau *et al.*, 2003).

Dentro de las especies, la estacionalidad parece ser estable año con año, con un marcado inicio y termino del periodo estacional, tanto en la ovulación como en la calidad y cantidad de producción de semen (Paul *et al.*, 2008). Esta precisa programación es debida a los mecanismos complejos los cuales permiten a los animales localizar su estación de reproducción para expresar la actividad sexual en el tiempo correcto, sincronizando los factores sexuales con los factores del ambiente externo. En los mamíferos estacionales, al igual que el reloj circadiano, un ritmo circa anual endógeno afecta los animales para generar periodos alternados de actividad sexual con descansos a través del año (Barrell *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que marcan el sistema circa anual se desconocen.

En los mamíferos todas las señales fóticas son percibidas específicamente a través de los ojos, los cuales transmiten, mediante la vía multisináptica hacia la glándula pineal, desde donde se

transduce el mensaje fótico a un mensaje químico, mediante la secreción de melatonina. La melatonina es sintetizada por la glándula pineal, específicamente durante periodos de oscuridad, posteriormente esta melatonina es entregada hacia el cerebro vía el fluido cerebroespinal, y a los tejidos periféricos a través de la circulación general. Para controlar la actividad reproductiva en el caso de ovejas, la melatonina actúa sobre el hipotálamo premamilar donde sus receptores específicos son expresados, y en turno controlan la actividad pulsátil de LHRH y LH que manejan el comportamiento sexual desde las gónadas, los cuales son estimulados aproximadamente 45 días después del inicio de la producción diaria de melatonina (Chemineau *et al.*, 2008). Este modelo ampliamente revisado por (Malpaux, 2006) aún puede tener algunas “lagunas”, ya que existen otros factores en las células que manejan la secreción de melatonina así como la pulsatilidad de LHRH. Por ejemplo, la actividad dopaminérgica inhibe la pulsatilidad al final de la comunicación neural durante los días largos en ovejas (Thiery *et al.*, 1989). Esto es interesante ya que la dopamina de la eminencia media se correlaciona también con la inhibición de la liberación de gonadotropinas que se da durante los días cortos en algunas especies (Glass *et al.*, 1988).

A pesar de todo los mecanismos que delinean el control central del sistema gonadotrópico por la melatonina aún se mantiene dentro de “la caja negra del conocimiento”, numerosos experimentos usando variaciones foto periódicas se siguen proponiendo con el propósito de ayudar a los productores a entender estos fenómenos y aplicar técnicas en el manejo reproductivo y la estacionalidad de sus animales. En el caso de las cabras, se propone un tratamiento fotoperiódico, controlando la disponibilidad de luz, asociado con el “efecto macho”, el cual consiste en la

separación temporal del macho cabrío por al menos 45 días antes de la copulación, para inducir la ovulación y el comportamiento estral, (>75 %, y doble cría) aún fuera de la estación reproductiva (Chemineau *et al.*, 1996).

3.3. MODELO DE RECARGA METABÓLICA Y PUBERTAD

Se ha propuesto un modelo metabólico que indica la importancia de la disponibilidad de energía para una correcta función ovárica antes y después del parto (Ellison, 2001; Valeggia y Ellison, 2004). La propuesta del modelo de recarga metabólica se basa en que la mayor determinante en la función ovárica posparto es la disponibilidad de energía para realizar las funciones reproductivas aún en el mantenimiento de la lactancia para soportar la crianza. El modelo de recarga metabólica implica presumiblemente la comunicación directa entre los canales de función reproductiva y del metabolismo de energía. Existen evidencias de estos canales de comunicación a los diferentes niveles tanto endocrinos como neuronales (Mircea *et al.*, 2007; Schneider, 2004) y a todos los sitios a lo largo del eje hipotálamo, pituitaria gónadas (HPG). Además, algunas investigaciones proponen que la apropiada función del eje HPG es modelado por factores metabólicos y nutricionales (Fernández *et al.*, 2006).

Aunque la precisión de los circuitos neuroendocrinos y las señales moleculares que realizan esta regulación han sido descubiertos en los últimos años y parecen ser los responsables de coordinar las principales vías mediante las cuales el cuerpo obtiene la información acerca de las principales vías y fuentes de energía disponibles en el cuerpo (Mircea *et al.*, 2007). Las hormonas más conocidas por su acción en el metabolismo energético son la hormona de la tiroides, cortisol y la

insulina. Se ha demostrado que esta última tiene un importante efecto en la función reproductiva, ya que cuando hay bajos niveles de T3 y T4 influyen la actividad ovárica mediante la interrupción de los enlazadores de globulinas e incrementando la secreción de prolactina (Poppe *et al.*, 2008). Altos niveles de cortisol, una hormona catabólica, altera la secreción de GnRH, y por consiguiente, disminuye la frecuencia de los picos de LH (Charmandari *et al.*, 2004).

El rol de la insulina y los factores de crecimiento análogos de insulina (IGF) sobre las funciones reproductivas ha sido reconocido desde hace tiempo (Poretsky y Kalin, 1987). La insulina es necesaria para la producción de diversas hormonas. Actúa sola y en conjunción con las gonadotropinas para estimular el ovario y producir estrógenos y progesterona (Greisen *et al.*, 2001). Esto fue conocido mediante las vías de señalización que realzan la expresión de los genes y enzimas que son cruciales para la actividad endocrina de los ovarios. Cualquier mal disfunción en las vías de señalización se asocia con algunos defectos en la reproducción por ejemplo, el síndrome de ovario poliquístico, el cual es caracterizado por la resistencia a la insulina y desordenes ováricos, incluyendo la anovulación (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2008).

A nivel del cerebro la insulina es requerida para la función normal de la reproducción. Los receptores a insulina que se expresan a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo han sido relacionados con el balance de la energía. Además, los receptores a Insulina son diferencialmente expresados en la porción media del núcleo arcuato, y esta región controla el flujo y liberación del neuropéptido Y, uno de los principales moduladores de la liberación de GnRH (Hill *et al.*, 2008). Por esto, aún se mantiene la duda acerca de la real evidencia que demuestre que el hipotálamo y

las neuronas GnRH tengan receptores a GnRH (Salvi *et al.*, 2006) apuntando que el pulso generador de la liberación de GnRH es sensible al estrés energético.

Los mediadores que regulan la expresión y el estado energético del cuerpo hacia los centros hipotalámicos que regulan la reproducción recientemente han sido descubiertos, algunos estudios han identificado tanto hormonas periféricas como la Grelina (Fernández *et al.*, 2006) y mediadores centrales como las kipeptinas hipotalámicas (Castellano *et al.*, 2006; Smith, 2008) y el neuropéptido Y (Toufexis *et al.*, 2002; Woodside *et al.*, 2002). Sobre todo estos estudios demuestran que la energía suplementada a corto plazo, algunos factores hormonales actúan sinérgicamente en diversos procesos importantes para realzar actividades como la reproducción para la conservación y sobrevivencia.

Las condiciones nutricionales y de disponibilidad de energía en el útero durante la edad temprana de la niñez, mediados por los acarreadores como la insulina, leptina y otras adiponectinas, pueden determinar la sensibilidad de la función reproductiva durante la pubertad y la edad adulta basados en la disponibilidad de la energía (Kuzawa, 2007), cronológicamente, ambientes desfavorables pueden activar la cascada de mecanismos metabólicos que optimizan el manejo de energía y dirigirla a realizar actividades de mayor impacto incluyendo el crecimiento y desarrollo reproductivo.

Estas normas de reacción aparentemente se observa en poblaciones humanas: las mujeres en países subdesarrollados quienes tienen condiciones marginales y de desnutrición se mantienen dentro del promedio estándar de fertilidad y aun por arriba del promedio (Vitzthum, 2001). Estas

mujeres tienden a entrar en la menarquia a mayor edad (Gluckman y Hanson, 2006), mantienen bajos niveles de hormonas ováricas (Jasienska y Jesiensi, 2008) y reaccionan dramáticamente a los cambios de alimentación y el estado nutricional.

3.4. BETACAROTENO

3.4.1. Nomenclatura, estructura y propiedades químicas

La vitamina A es un término designado a cualquier compuesto que tiene actividad biológica de retinol como lo muestra la figura 3 (IUPAC-IUB, 1982). La palabra “retinoides”, introducido inicialmente por Sporn *et al.*, (1976), fue designado por la IUPAC-IUB en 1982 para incluir “compuestos que consisten de cuatro unidades isopropenoides unidas a un monómero a manera de cola; todos los retinoides pueden ser formalmente derivados de un compuesto parecido mono cíclicamente conteniendo cinco enlaces dobles de carbono y terminar en un grupo funcional con el termino de porción acíclica. Con esta definición, los retinoides pueden incluir tanto las formas naturales como muchos análogos de retinol sintéticos, con o sin actividad biológica.

El problema con esta definición es el hecho de que algunos compuestos sintéticos, tal como el TTNN (ácido-tetrahydro-tetrametil-binaftaleno-carboxílico (tetracíclico), el cual no entra en la definición de retinoides, ha demostrado ser mucho más activo que el retinol y ácido retinoico en algunos ensayos para la reactividad de la vitamina A o retinol. Sporn y Roberts (1985) además propusieron que “un retinol puede ser definido como una sustancia que puede provocar respuestas biológicas específicas al enlazarse y activar un específico receptor o serie de receptores”.

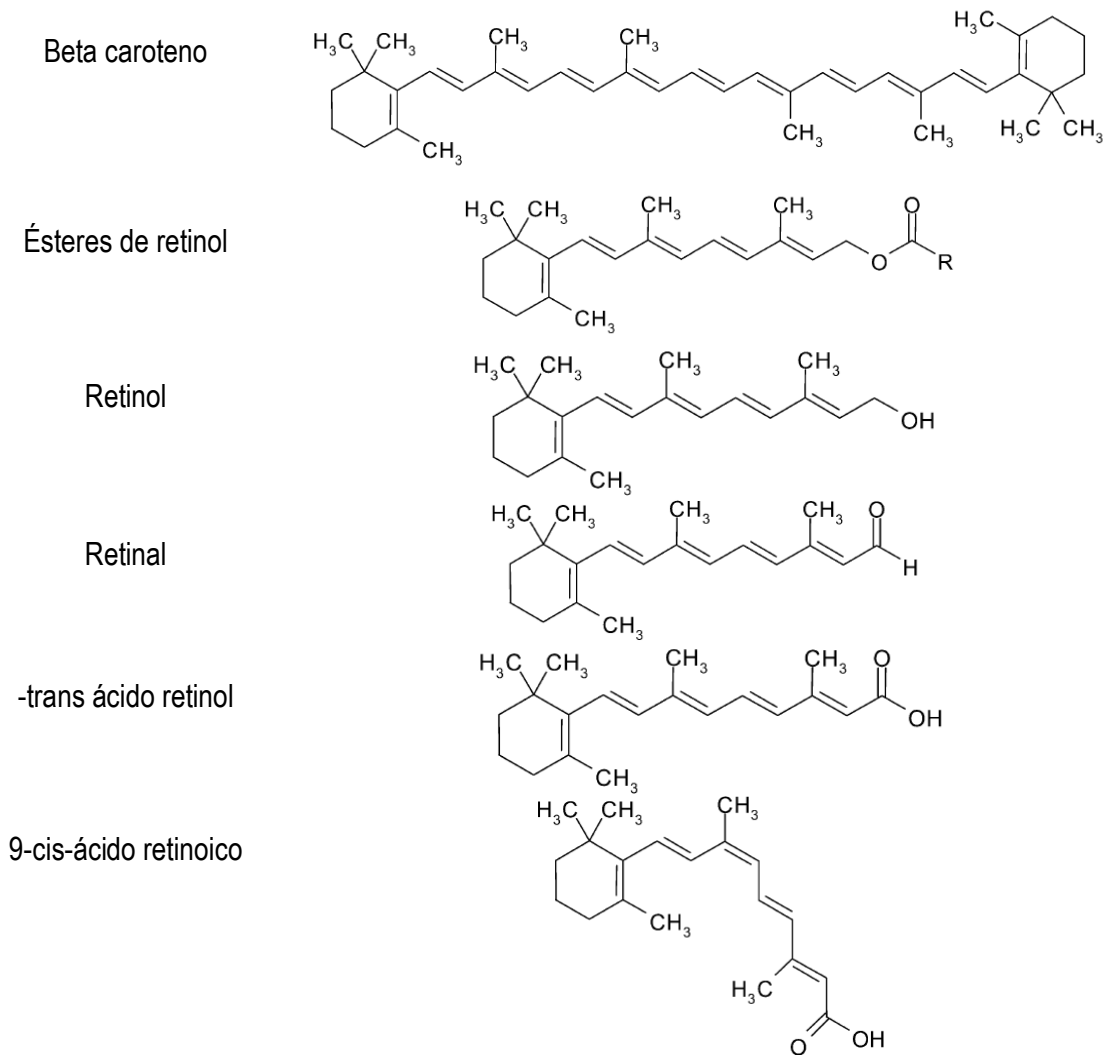


Figura 3. Formulas estructurales del betacaroteno y sus metabolitos que existen de manera natural.

En la práctica, la mayoría de los investigadores actualmente usan una combinación de estas definiciones, resumiendo a los retinoides y sus análogos como aquellas sustancias con o sin actividad biológica, que además dentro de cientos de compuestos que no están cercanamente al retinol pero que provocan actividad biológica como vitamina A o retinol.

Miles de retinoides han sido desarrollados sintéticamente, muchos de los cuales están actualmente en investigación para determinar su potencial biológico. Algunos agentes sintéticos que enlazan específicamente a los receptores de retinol X son llamados rexinoides (Rigas y Dragnev, 2005) los compuestos que han perdido su estructura de anillo son llamados retinoides acíclicos.

La familia de los compuestos retinoides de forma *–trans* son alcoholes primarios con peso molecular de 286. En la mayoría de los tejidos corporales de animales, el retinoide predominante es el palmitato de retinol, además de otros aceites o ésteres de retinol son encontrados. La mayoría de estos metabolitos se encuentran en la configuración *–trans*. La forma de *aldehído 11-cis* del retinol, se encuentra en la retina del ojo (Blomhoff y Blomhoff, 2006).

Todas las formas *–trans* y sus derivados son altamente inestables en la presencia de oxidantes y luz, los cuales tienden a degradarse por isomeración. Estas propiedades características de los retinoles requieren de tejidos que contengan soluciones estabilizadoras para almacenarlos y colocarlos en atmósferas fuera de iluminación. Las soluciones que contienen retinoles deben ser almacenadas en oscuridad a bajas temperaturas y con atmósferas libres de oxígeno, y además deben ser analizadas y preparadas frecuentemente (Gundersen y Blomhoff, 2001).

La vitamina A (todos los retinoles) es una vitamina soluble en grasas. Muchas proteínas enlazadoras son por esto enlazadas a los retinoides a través de fases hidrofóbicas tales como fluidos intra y extra plasmáticos. Muchos retinoides son por el contrario, solubles en medios tales

como el plasma. La solubilidad en agua puede darse a temperatura ambiente, pH de 7.3 para las formas –trans, de 60, 110 y 210 nM. Estas posibilidades hacen que todas las formas –trans de ácido retinoico una morfogénesis ideal con habilidad para difundirse eficientemente a través de las fases solubles en agua en las membranas celulares.

Originalmente las unidades internacionales (UI) fueron usadas para las recomendaciones nutricionales de vitamina A postulando 1 UI= 0.3µg de retinol de forma –trans. Posteriormente los “*equivalentes a retinol*” (RE) fueron usados para convertir todas las fuentes de retinol, provitamina A y carotenoides en la dieta como una simple unidad. Cuando se definió RE se asumió que la eficiencia de absorción de provitamina A y carotenoides era relativamente buena. Recientes estudios documentados demuestran que la absorción de betacaroteno es mucho más baja de lo que se pensaba, varía de acuerdo con la especie y su disposición. Un número alto de factores está asociado a su bio disposición y bio conversión como la relación proteína o energía, deficiencias de zinc, consumo de grasas, alcohol, infecciones y el grado de procesamiento de los alimentos. Basados en estos estudios, y ya que es limitado y poco conocido aún, se asume que la actividad de un equivalente de retinol es igual al consumo suplementado de 1 µg de vitamina A preformada; 2 µg de Betacaroteno o 24 µg de otra provitamina carotenoide como alfa caroteno o beta citoxantina (Trumbo *et al.*, 2001).

3.4.2. Ingesta de la vitamina A en las especies animales

Las especies animales no tienen la capacidad para la síntesis de vitamina A (*de novo*). Las plantas y algunas bacterias, algas, y hongos pueden sintetizar carotenoides, sin embargo, estos

carotenoides pueden ser convertidos a vitamina A por los animales. Los carotenoides representan un gran grupo de pigmentos dispersos en la naturaleza y responsables de los colores desde el amarillo, naranja y hasta el rojo de las frutas, vegetales y flores (Fraser y Bramley, 2004). Muchos de estos carotenoides pueden ser absorbidos y almacenados por los animales, y además, les da una coloración característica a sus tejidos. Por ejemplo, la luteína y la ziaxantonina son concentradas en las manchas, el licopeno en la próstata humana, el betacaroteno en el cuerpo lúteo de bovinos y la yema de huevo, antoxantina y cantaxantina en el músculo del salmón y en las plumas del flamenco (Fraser y Bramley, 2004). Los animales y plantas pueden, sin embargo, convertir los carotenoides en formas de moléculas biológicamente activas como el ácido abscísico en plantas, ácido trifórico en hongos y retinoides en animales (Nagao, 2004). Así, los carotenoides, incluyendo alfa caroteno y beta criptoxantina, en animales tal como la *Drosophila*, pescado, pollo, ratón, y humanos, es convertido en retinol o apocarotenoides (el cual después puede ser convertido en retinoides), y los animales obtienen compuestos como la vitamina A en forma activa directamente de la dieta.

Los animales pueden, de una forma alternativa, obtener la vitamina A alimentándose de tejidos de otros animales que ya han convertido la provitamina A de carotenoides en retinoides principalmente del hígado y se encuentra en especies como pescado, aves y algunos mamíferos. Por otro lado, algunos alimentos contienen altos contenidos de ésteres de retinol como la leche, margarina y la mayoría de los cereales. En los países de oriente, la ingesta típica de vitamina A va de un 25 a 75 % y proviene específicamente de provitamina A en forma de carotenoides (Harrison, 2005). El

ácido retinoico proveniente de fuentes animales no contribuye a la ingesta diaria de vitamina A, ya que los tejidos animales típicamente contienen solamente entre un 3 -15 µg de ácido retinoico por kilogramo dependiendo además del proceso y tratado del alimento (Gundersen y Blomhoff, 2001)

3.4.3. Absorción intestinal de los carotenoides y ésteres de retinilo

En general, se asume que la ingesta de carotenoides por los eritrocitos en el intestino delgado es por difusión pasiva. La eficiencia en la absorción de carotenoides puede ser baja cuando se incrementa la ingesta. Aún mas, la ingesta in vitro por las células indica que un proceso de saturación puede estar influenciando la difusión de carotenoides (Li y Tso, 2003). Moore (1930) describió que el betacaroteno puede ser convertido en retinol en el intestino delgado. Poco después, Karrer (1930) propuso un mecanismo de desencadenamiento central en el doble enlace del carbono 15,15'. La caracterización bioquímica de la actividad de una enzima fue independientemente descrita en los laboratorios de Dewitt Goodman (Goodman y Huang, 1965) y James Allen Olson (Olson y Hayaishi, 1965).

Ambos laboratorios fueron capaces de demostrar que este proceso de desacople en el doble enlace central del carbono 15,15' producía dos moléculas de retinol, como ellos observaron que el proceso enzimático era dependiente de una molécula de oxígeno, sin requerir otros factores, la enzima fue llamada β,β -caroteno-15,15'-monoxigenasa. La clonación molecular de esta enzima fue, sin embargo, reportada hasta recientemente. von Lintig y Vogot (2000) clonaron la enzima en *Drosophila*, mientras que Wyss y colaboradores (2000) la clonaron en pollos.

Un mecanismo adicional al desdoblamiento del betacaroteno se ha identificado. Tanto en las observaciones originales de Glover y Redfearn (1954), se han sugerido que existen enzimas que hidrolizan en niveles asimétricos, Napoli y Race, (1988) y Wang *et al.*, (1996), sugiere que el “corte” asimétrico existe, y es llamado como un corte excéntrico, produciendo la formación de dos moléculas de Beta apocaroteno, con diferentes longitudes de cadenas, la más larga de las dos es subsecuentemente hidrolizada enzimáticamente para formar ácido retinoico o retinal. La enzima responsable de este corte asimétrico fue recientemente clonada por von Liting y sus colaboradores (Kiefer *et al.*, 2001). Es llamada β,β -caroteno-9',10'-dionoxigenasa, corta al betacaroteno, pero además, a otros carotenoides como la luteína. El retinal es formado en el lumen intestinal como un producto central, así mismo, el corte asimétrico de los carotenoides es posteriormente reducido a retinol. Además, algunas reductasas del retinol son capaces de catalizar esta reacción *in vitro* la actividad de las reductasas que actúan *in vivo* en el intestino no han sido identificadas aún (Li y Tso, 2003).

Los ésteres de retinilo presentes en la dieta son convertidos a retinol en el lumen intestinal antes de ser convertidos en eritrocitos. El triglicérido de la lipasa pancreática intestinal y la enzima fosfolipasa B en el borde del lumen intestinal son los responsables de su hidrólisis. El retinol no esterificado es tomado por los eritrocitos mediante un proceso de saturación de acarreadores, aunque las proteínas implicadas en este proceso no han sido aún reconocidas o caracterizadas, en la ingestión de dosis farmacológicas de retinol o ésteres de retinilo, un proceso dependiente de difusión no saturada puede estar involucrado (Harrison, 2005).

En los eritrocitos, el retinol es enlazado por las proteínas enlazadoras específicas, llamadas proteínas celulares enlazadoras de retinol tipo II, (CRBP-II), éstas se encuentran mayormente presentes en las células absorbentes de la mucosa intestinal aproximadamente en cantidades del 1% de las proteínas solubles de la mucosa (Crow y Ong, 1985). Algunos estudios con CRBP-II en ratones, han demostrado que estas proteínas juegan un rol importante, pero no esencial, en la absorción intestinal de la vitamina A, ya que los ratones alimentados con dietas enriquecidas en vitamina A, reducen sus ésteres de retinilo almacenados en el hígado (cerca del 40 %) comparados con los ratones normales, presuntamente por la alta cantidad de vitamina A en la dieta disponible para absorción diaria (E X *et al.*, 2002)

La mayoría del retinol es reesterificado en largas cadenas de ácidos grasos, mayormente palmitato, en los eritrocitos después de la absorción. Las proteínas enlazadoras, (CRBP-II) facilitan la esterificación de retinol por la enzima lecitina: retinol acil transferasa (LRAT) (Herr y Hong, 1992). Además el rol de la CRBP-II es disolver las grasas, con el fin de proteger el retinol de la degradación. La gran mayoría de los ésteres de retinil formados son incorporados en quilomicrones, consisten en agregados de miles de moléculas de triglicéridos y fosfolípidos empaquetados de manera conjunta con los carotenoides, ésteres de retinil, pequeñas cantidades de retinol, ésteres de colesterol, y pequeñas cantidades de poliproteínas. Estos largos complejos de poliproteínas (100-2000 nm de diámetro) son después secretados por los eritrocitos hacia la linfa intestinal (Blomhoff *et al.*, 1990). Aunque la mayoría de la vitamina A absorbida es secretada en las vías linfáticas como ésteres de retinil en quilomicrones, grandes cantidades son

secretadas en la circulación portal como retinol no esterificado (Harrison 2005). La absorción portal es igualmente importante para las condiciones patológicas que afectan los quilomicrones tal como las lipoproteínas beta.

3.4.4. Metabolismo del retinol en el hígado

Después de la secreción de quilomicrones en el fluido linfático, estas partículas de lipoproteínas se mueven en la circulación general donde algunos procesos tal como la hidrólisis de triacilglicéridos y el intercambio de poliproteínas dan como resultado la formación de partículas remanentes de quilomicrones, la mayoría de los ésteres de retinil presentes en estos remanentes son enganchados por partículas durante la conversión de quilomicrones. Los restos de quilomicrones son recogidos por las células del parénquima del hígado llamados hepatocitos (Blomhoff *et al.*, 1982). La captación hepática extra de restos de quilomicrones, puede sin embargo, ser importante en la liberación de ésteres de retinil y carotenoides a tejidos como médula ósea, glóbulos rojos periféricos, vaso, tejido adiposo, músculo esquelético y riñones (Paik *et al.*, 2004).

En los hepatocitos, los ésteres de retinol son hidrolizados. El retinol no esterificado puede ser asociado con sus proteínas enlazadoras (RBP), ya que esta proteína se encuentra en grandes cantidades en el retículo endoplásmico de células hepáticas (Newcomer y Ong, 2000). Una vez enlazado a sus proteínas acarreadoras, aparentemente inicia la traslocación de las RBP desde el retículo endoplásmico hacia el complejo del aparato de Golgi, para posteriormente ser secretado hacia el plasma sanguíneo. Adicionalmente, una gran cantidad de retinol no esterificado en los hepatocitos, es transferido a otro tipo de células del hígado llamadas células estrelladas

pericinosoidales (Blomhoff *et al.*, 1982, 1984). De hecho, cuando existen altas cantidades de vitamina A la mayoría de los remanentes de quilomicrones que contienen ésteres de retinil tomados por los hepatocitos son transferidos hacia las células pericinosoidales para su almacenamiento en el hígado.

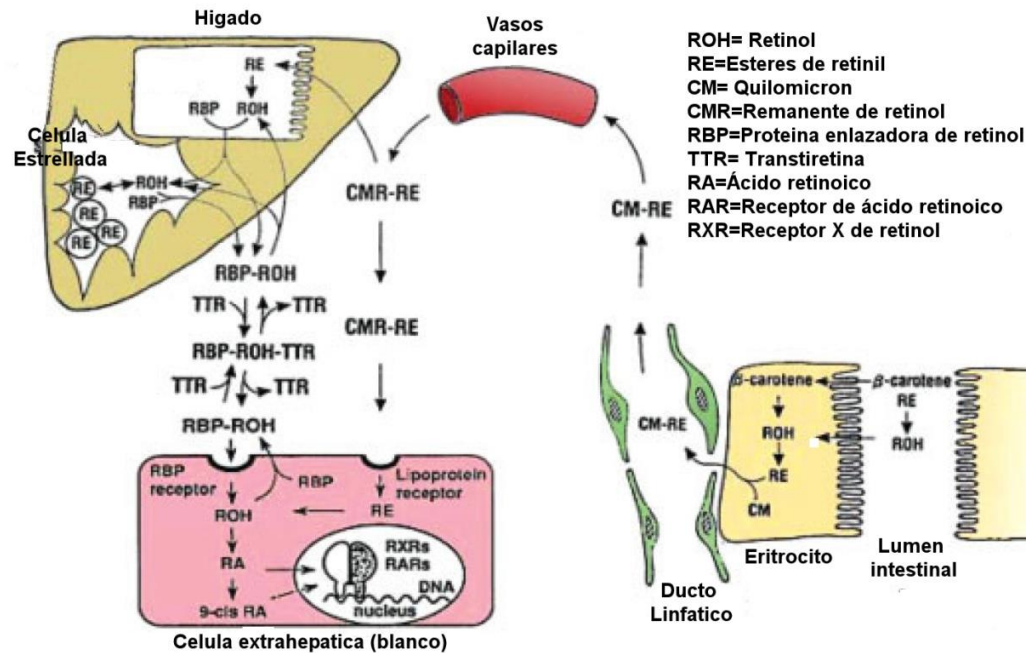


Figura 4. Metabolismo del retinol en las células del hígado.

En los mamíferos, entre el 50 y 80 % del total de retinol encontrado en el cuerpo (retinol mas ésteres de retinol) es mayormente presente en las células del hígado, de éste el 95% se encuentra almacenado en las células pericinosoidales. Los ésteres de retinil en forma de gotas se encuentra cerca del 30 y 35% (Senoo, 2004). Las células del hígado son la principal fuente de reserva de vitamina A para los animales, por algunas semanas o meses, manteniendo las concentraciones de retinol en sangre entre 1 y 2 μM a pesar de las fluctuaciones normales por la ingesta diaria de

vitamina A. El mecanismo responsable de la movilización de las células del hígado a el resto del cuerpo no ha sido estudiado claramente, sin embargo, se presume que está involucrado las mismas células enlazadoras de retinol (Quadro *et al.*, 1999).

Además del almacenamiento en las células hepáticas, los tejidos intermusculares y otras células de órganos tales como el pulmón, riñones y los intestinos de los vertebrados mayores pueden acumular retinol en gotas lipídicas después de la ingestión de provitamina A o betacaroteno (Nagy *et al.*, 1997) estas fuentes alternas de almacenamiento de ésteres de retinil y retinol funcionan como fuentes locales de vitamina A para los órganos con mayor demanda, por ejemplo, las células del parénquima en la retina almacenan grandes cantidades de pigmentos que son utilizados para la función normal de la vista. Notablemente las mayores cantidades de ésteres de retinol son almacenados en pequeñas gotas de lípidos en el citoplasma de las células en los tejidos intestinales y vísceras de pequeños vertebrados como la lamprea, *Petromyzon spp* (Blomhoff y Wake, 1991). En general las proteínas enlazadoras de retinol I, II y III (CRBP-I, II y III) y las enzimas LRAT y ARAT son las partículas más importantes en la esterificación del retinol, específicamente la CRBP-III y la LRAT son necesarias para la incorporación de los ésteres de retinil en la leche.

3.4.5. Transporte de retinol en la sangre

Inicialmente Kanai y sus colaboradores (1968) en el laboratorio de Goodman demostraron que el retinol se enlaza a una proteína específica en la sangre, la llamaron proteína enlazadora de retinol

(RBP). Las concentraciones de RBP en el fluido sanguíneo son reguladas y mantenidas cerca de las 2 nM a pesar de las fluctuaciones ocasionadas por la ingesta diaria de betacarotenos. Solamente cuando existen severas deficiencias de vitamina A, esto es, cuando el hígado ha liberado sus reservas de ésteres de retinil, las concentraciones de las proteínas enlazadoras en sangre decrecen. Aproximadamente 95% de las RBP es asociado con la transtiretina (TTR) en cantidades iguales (1:1) (Peterson, 1971). La transtiretina es un enlazador que reduce la filtración glomerular de retinol.

Las RBP consisten de una forma hidrofóbica especializada y diseñada para proteger la molécula liposoluble del retinol (Zanotti y Berni, 2004). Las RBP pertenecen a una gran familia de proteínas (familia de las lipocalinas), las cuales incluyen un gran número de compuestos enlazadores de proteínas lipídicas solubles tal como los odorantes y el colesterol (Newcomer y Ong, 2000). Por otro lado, las células del parénquima en el hígado son cuantitativamente el primer sitio de síntesis de estas proteínas, sin embargo, las células de otras partes del cuerpo son igualmente capaces de sintetizar este compuesto. También se han establecido sitios donde el retinol puede ser reciclado intensivamente para su reutilización específicamente entre los tejidos extra hepáticos, hígado y liberado al plasma (Cifelli, 2005), por esto una gran cantidad de retinol es tomado por muchos tipos de células del cuerpo y una menor porción es convertido en metabolitos activos o degradado en el hígado. Algunos estudios indican que los RBP no son esenciales en el movimiento de los retinoles en la mayoría de los tejidos (Quadro *et al.*, 2003). El mecanismo de movimiento de retinol

para el proceso no mediado por RBP aún no ha sido caracterizado, pero se presume de un proceso de simple difusión pasiva en las membranas celulares

Un gran número de compuestos asociados al retinol y ésteres de retinil, están presentes en la sangre en concentraciones nanomolares, entre 5 y 10 nM. Estos incluyen todos los ácidos reinoicos –trans, 13-cis, 13-cis-4-oxo, -trans-4-oxo y el β -glucuronide (Barua y Sidell, 2004). Con excepción del β -glucuronide, son encontrados y transportados en sangre enlazados a la albúmina. Los niveles circulantes de estos carotenoides son dependientes del consumo diario de vitamina A y típicamente incrementa de dos a cuatro veces más después la ingestión de grandes cantidades de carotenoides o provitamina A (Hartmann *et al.*, 2005). No se sabe claramente si estos retinoides en plasma simplemente reflejan el catabolismo o si son asimilados y utilizados por las células. Sin embargo, ya que la mayoría de estos retinoides están activos en sistemas *in vitro* en concentraciones nanomolares, se puede asumir que estos metabolitos en plasma tienen un papel funcional.

Los carotenoides son solubles en grasas y transportados en el plasma, anclados a lipoproteínas. Se absorben directamente de la dieta e ingresan a la linfa en asociación con los quilomicrones principalmente en el hígado. Los carotenoides que no se acumulan en las células del hígado son movilizados como componentes de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) en la circulación por un proceso de reensamble en la formación de quilomicrones (Parker, 1996). Ya que muchas células tiene la capacidad de sintetizar el retinol, retinal o ácido retinoico de los carotenoides y

provitamina A, las lipoproteínas pueden ser importantes en la regulación de las concentraciones circulantes para la función celular de la vitamina A.

3.4.6. Formación de ácido retinoico y retinol en la célula.

Los metabolitos del retinol son sintetizados en las células blanco específicas. La mayor fuente de –trans retinoles en vertebrados mayores está en el fluido sanguíneo y proceden del hígado. Sin embargo, la entrada de lipoproteínas conteniendo ésteres de retinil, retinol y carotenoides hacia la célula, y además de los ésteres almacenados localmente en gotas cercanas contribuyen a la síntesis de metabolitos de retinoides activos.

Los retinoides de forma –trans son los metabolitos más activos en la célula, su síntesis ocurre en una reacción de dos pasos. El primer paso y además limitante en este proceso es la oxidación de retinol a retinal, y el paso final es la oxidación de retinal a ácido retinoico. Algunas células son capaces de catalizar la reacción inversa es decir de retinal a retinol. La principal función del ácido retinoico es actuar como un activador de factores de transcripción. Otro importante retinoide activo es el 11-cis retinal, su función está principalmente asociada al proceso de intercambio de luz en la vista. Recientemente ha sido evidenciada la función de muchos retinoides, además de ser solamente la sustancia activa de los compuestos de la vitamina A.

3.4.7. Oxidación de los retinoles

Gran cantidad de datos acerca de la cadena media citosólica de alcohol deshidrogenasa 1, 3 y 4 (ADH1, 2 y 4) como las enzimas involucradas en la oxidación de todas las formas –trans de

retinol y retinal. Estas son todos los oxidantes in vitro, la ADH4 parece ser la más activa. La enzima ADH3 es la comúnmente expresada, mientras que los patrones de expresión de la AHD1 y ADH4 son más específicos al actuar en ciertos tejidos para estas proteínas. Las enzimas ADH no parecen ser las oxidantes para las proteínas enlazadoras de retinol (RBP) (Duester *et al.*, 2003)

Otra enzima que parece ser importante en la oxidación de retinol y sus metabolitos es la deshidrogenasa/reductasa enlazadora de la membrana (SDR), perteneciente a la familia de las enzimas microsomales incluyendo la RDH1, RDH5 y retSDR1 (Duester *et al.*, 2003). Las SDR utilizan los retinoles enlazados a sus proteínas enlazadoras (RBP I). CRBP-I actúa como un acompañante que dirige el retinol directamente a ser metabolizado por estas enzimas (Everts *et al.*, 2005)

Se ha establecido que algunas enzimas son las responsables de la oxidación del retinol y convertirlo en ácido retinoico. La enzima llamada Retinol Deshidrogenasa tipo 1 (RALDH1, también citada como ALDH1A1, ADH-2 y ALDH1) se expresa en altos niveles en la retina de embriones y en algunos tejidos epiteliales de animales adultos (Haselbeck *et al.*, 1999). Se ha observado también en niveles menores en la retina dorsal y extensiones dorsales de embriones sugiriendo que esta enzima no es esencial para la síntesis de ácido retinoico en la mayoría de los tejidos (Duester *et al.*, 2003). A pesar de esto, se sugiere que RALDH1 es el principal involucrado en el metabolismo de retinol cuando éste se encuentra en niveles excesivos.

RADH2 (también llamado ALDH1A2 y V2) se encuentra presente en muchos tipos de células, tanto en embriones como tejidos adultos originales en embriones es localizado especialmente en

células mesodérmicas, incluyendo en tronco del mesodermo del corazón proximal al brote de la linfa, y en los brotes de pulmones así como en el corazón (Niederreither *et al.*, 1997). Aparentemente, la RADH2 es responsable de la producción de ácido retinoico en las células durante el desarrollo embrionario.

RALDH3 (también conocida como ALDH1A3, V1 y ALDH6) ha sido localizada en la retina, cristalino, sistema olfatorio, así como en líneas urinarias y la superficie del ectodermo cerebral en desarrollo de animales como ratón y aves (Dupe *et al.*, 2003). Algunas malformaciones embrionarias pueden ser prevenidas tratando a la madre con ácido retinoico durante la preñez. Los datos indican que diferentes órganos y células usan diferentes mecanismos (por ejemplo RALDH1, RALDH2 o RALDH3) para obtener y suplir sus necesidades para la síntesis de ácido retinoico (Niederreither *et al.*, 2003).

El RALDH4, el cual se ha encontrado principalmente en hígado y riñón de animales ha demostrado ser el más activo in vitro en orden de magnitud para la síntesis de ácido retinoico 9-cis (Lin *et al.*, 2003), lo cual indica que este es el involucrado en la síntesis de ácido retinico 9 – cis

El betacaroteno y otros compuestos carotenoides pueden ser fuente de ácido retinoico, particularmente en algunas especies que son capaces de acumular altas concentraciones de carotenoides en sus tejidos, como los mono gástricos. El ácido retinoico es sintetizado a partir del betacaroteno en órganos como el intestino, hígado, riñón y pulmón, aun sin la oxidación previa de betacaroteno a retinol (Hebuterne *et al.*, 1996).

3.4.8. Catabolismo celular de los retinoides

El catabolismo es un importante mecanismo para controlar los niveles de ácido retinoico en las células y tejidos de animales. White *et al.*, (1997) clonó la enzima P450 citocromo (CYP26A1) del pez cebra, que es una de las encargadas de metabolizar el ácido retinoico. Las células transfectadas con el gen clonado fueron capaces de metabolizar todas las formas de ácido retinoico en metabolitos polares, incluyendo el hidroxí-ácido retinoico y epoxi-ácido retinoico. La enzima fue después clonada en humanos, ratón, rata y pollos (Swindell *et al.*, 1999). La enzima CYP26A1 posteriormente se encontró en varias partes del cuerpo, principalmente y con altas concentraciones en el hígado, duodeno, colon, placenta y algunas regiones del cerebro (Lampen *et al.*, 2001). La región próxima superior del gen de la enzima CYP26A1 contiene un grupo funcional RARE, y su transcripción además es inducida por el ácido retinoico. Además, estos resultados implican un mecanismo directo a través del cual el gen CYP26A1 es sensible a las concentraciones de ácido retinoico y consecuentemente regular el metabolismo oxidativo del retinol.

Una segunda enzima, la P450 llamada CYP26B1, fue posteriormente clonada (White *et al.*, 2000). Esta enzima es específica de ciertos tejidos y su patrón de expresión es similar que la CYP26A1, además, tienen la misma actividad catalítica. Más recientemente, una tercera enzima, CYP26C1 fue clonada por Taimi y colaboradores (2004). Esta afecta las mismas células donde se expresa CYP26A1, convirtiendo el ácido retinoico a metabolitos polares solubles en agua, similar como actúa CYP26A1 y CYP26B1. Sin embargo la CYP26A1 puede catabolizar el 9-cis ácido retinoico

mejor que las A1 y B1. Esta enzima no es ampliamente expresada en las células de animales adultos, ya que es inducida por el ácido retinoico. Los patrones expresión de CYP26A1, B1 y C1 generalmente no se traslapan entre sí, por lo que se sugieren roles individuales para cada una de las enzimas en el catabolismo de ácido retinoico (Reijntjes *et al.*, 2004).

Además, los glucorinoides pueden ser formados de ácido retinoico y retinol, como metabolitos principales, destinados a la excreción, vía bilis, o bien por la vía urinaria (Barua y Olson, 1986). Algunos de los productos de la degradación importantes incluyendo las formas hidroxí, oxo y beta glucorinides son capaces de mantener su función biológica activa (Reijntjes *et al.*, 2005). Algunos investigadores han estudiado el catabolismo de los retinoides analizando el contenido de metabolitos en muestras fecales, urinarias y biliares. En estos estudios se han detectado gran cantidad de metabolitos polares, incluyendo retinoles conjugados con taurina, productos de la descarboxilación, ipoxidación e isomeración (Frolik, 1984). El catabolismo parece ser similar tanto para el ácido retinoico como para el retinol en ambas vías no está claramente diferenciado cuales enzimas pueden actuar en cada uno de los casos. La enzima enlazadora de ácido retinoico celular tipo 1 (CRABP-I) parece ser la más común asociada con la degradación del ácido retinoico. Específicamente Boylan y Gudas (1991 y 1992) demostraron que la expresión de la proteína de CRBP-I es una excelente degradadora de ácido retinoico en las células.

3.4.9. Receptores celulares del ácido retinoico como factores de transcripción

En 1987, el receptor de ácido retinoico (RAR) que pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroidales de la tiroides fue clonado independientemente, por Pierre Chambon y Ronald M. Evans. Esta familia de receptores nucleares comprende todos los factores enlazados dependiente de la regulación de la transcripción de genes enlazados a pequeñas secuencias de ADN. Poco después, otros dos RARs fueron identificados: el RAR β (Evans, 2004) y RAR α (Chambon, 2004), algunas comparaciones entre las secuencias de aminoácidos entre estos tres receptores sugieren que cada uno tiene una función diferente, por lo cual se dividió en subfamilias de receptores, de acuerdo a su función (Petkovich, 1992).

Las RARs funcionan como heterodimeros nucleares, que se enlazan con cadenas de ADN llamadas elementos responsivos a los receptores de retinol (RAREs o RXREs) que se localizan en los genes promotores. Los RAREs consisten de repeticiones directas de secuencias medias de “(a/g)g(g/t)tca” separadas comúnmente por cinco (DR5) o dos (DR2) nucleótidos (Balmer y Blomhoff, 2005).

Recientes estudios revelaron que la expresión de CRBP-II aumenta la transcripción de RAR, esto fue demostrado ya que CRBP-II se encuentra predominantemente en el citosol en ausencia de su enlazador, su respuesta es la traslocación del ácido retinoico hacia el núcleo, donde éste es asociado directamente con su RAR (Budhu y Noy, 2002). De la misma manera, el complejo

formado por CRBP-II y RARs envía la señalización mediante canales de enlace que potencializan la actividad de transcripción (Budhu *et al.*, 2001).

Los RARs realizan diferentes funciones de transcripción, mediante el reclutamiento de proteínas importantes de acción positiva o negativa, referidas como coactivadores o correpresivas. El efecto de los genes puede ser de represión, para liberar la represión, activador de genes o trans represión de genes. Los cofactores no son exclusivos de receptores celulares y son usados de similar manera por muchos otros factores de transcripción enlazados al ADN (Perissi y Rosenfeld, 2005).

Información importante acerca del rol de varios RARs y RXRs ha sido obtenida de estudios donde alguno o varios de los receptores genéticos han sido eliminados en ratones. Cuando las mutaciones solamente afectan un receptor los ratones sobreviven y las anormalidades son limitadas, sugiriendo una función de apoyo entre varios receptores y sus isoformas. En una anormalidad doble mutante en cualquiera de los subtipos de receptores RAR o RXR los animales experimentales no sobreviven y las anormalidades son más pronunciadas (Azais-Braesco y Pascal, 2000)

3.5. FISIOLOGIA DEL ACIDO RETINOICO

El ácido retinoico es un factor clave en el desarrollo y diferenciación de los tejidos y órganos de los vertebrados, debido a su habilidad para promover (Niles, 2004) la regulación de la apoptosis (Jiménez Lara *et al.*, 2004). El ácido retinoico fue el primer activador del gen de morfogénesis identificado en vertebrados (Vergara *et al.*, 2005), y en numerosos estudios ha sido demostrada la

importancia fisiológica del ácido retinoico incluyendo el desarrollo de la linfa, ojos, pulmones, sistema nervioso central, reproducción y hematopoyesis. Además de su función en condiciones patológicas como en cáncer, enfermedades de la piel, nacimientos prematuros, artritis reumatoide y osteoporosis.

3.5.1. Rol del ácido retinoico en el sistema nervioso central

El ácido retinoico es de especial interés para los neurobiólogos debido a su importante función en el desarrollo y madurez del sistema nervioso central (Vergara *et al.*, 2005). El ácido retinoico se encuentra presente en altos niveles durante el desarrollo del sistema nervioso central, cuando se altera sus concentraciones los individuos presentan severas anormalidades incluyendo ausencia de formaciones en el encéfalo, anormalidades en la parte dorso ventral de la espina dorsal y el bloqueo en el crecimiento de neuritas de la espina dorsal hacia la periferia del cuerpo (Maden y Hind, 2003).

En el cerebro adulto, el ácido retinoico parece estar involucrado en la comunicación sináptica del hipocampo. Además de ello, el ácido retinoico está relacionado con la relación espacial de la memoria, para la maduración del aprendizaje (Denisenko y Mello, 2001), en el control de la señalización de la dopamina de las neuronas mesolímbicas y mesoestriadas, además como en la sobrevivencia de las neuronas negroestriadas dopaminérgicas (Vergara *et al.*, 2005). El rol del ácido retinoico en la regeneración de la espina dorsal ha sido estudiado usando implantes de cordón dorsal de adultos, los cuales presentan capacidad para extender las neuritas cuando se

cultivan en altas concentraciones de ácido retinoico además de que inducen la extensión de los axones (Vergara *et al.*, 2005)

3.5.2. Rol de la vitamina A en la maduración citoplasmática de oocitos

La vitamina A es una de las vitaminas liposolubles de importancia en la regulación de desarrollo, crecimiento y diferenciación celular, así como en la función de los tejidos. Los primeros estudios de vitamina A en la reproducción de ganado se enfocaron en las técnicas de mejoramiento reproductivo encontrando múltiples funciones específicamente durante el desarrollo y crecimiento folicular, esteroidogénesis, ambiente del oviducto y uterino, función inmune, maduración de oocitos y el desarrollo del embrión.

Los oocitos son formados durante la etapa fetal y son inhibidos en el estado de profase de la primera división meiótica. Después de la pubertad, los oocitos pasan del estado de profase hacia el estado de vesículas germinales, durante las oleadas foliculares del ciclo estral, reiniciando la meiosis en respuesta al pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) llevándolos hasta el estado de la metafase de la segunda división mitótica. Este proceso es llamado maduración de oocitos (Thibault *et al.*, 1987) y es considerada no sólo como la reactivación de la meiosis (maduración del núcleo) sino además, como la adquisición de competencia para el desarrollo (maduración citoplasmática) para el desarrollo después de la fertilización (Bever *et al.*, 1997). Se ha demostrado que alrededor de las células foliculares, particularmente las células del *cumulus*, son importantes para la apropiada maduración del citoplasma (Kim *et al.*, 1997).

Recientemente, usando técnicas de maduración *in vitro*, se ha demostrado la importancia que tiene la vitamina A en la maduración de oocitos (Hidalgo *et al.*, 2003). Algunos estudios se han enfocado a descubrir el efecto del vitamina A en la maduración citoplasmática de oocitos en ganado, se han realizado experimentos cronológicos, pruebas de metabolitos de Vitamina A en técnicas de reproducción incluyendo inseminación artificial, superovulación, crecimiento de óvulos, y maduración *in vitro* para detectar los posibles efectos benéficos.

El ganado toma la vitamina A principalmente como betacaroteno en los forrajes o en forma suplementada como ésteres de retinol de alimentos formulados (ANNRC, 2001). Grandes cantidades de betacaroteno y ésteres de retinol son destruidas en el rumen (Weiss, 1998). Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen intestinal para producir retinol. El retinol y betacaroteno son absorbidos por las células de la mucosa intestinal. Dentro de las células intestinales, algo de betacaroteno tiende a enlazarse en un proceso enzimático para formar retinal, el cual es subsecuentemente reducido a retinol. Todo el retinol es reesterificado dentro de las células para almacenarse como quilomicrones que posteriormente son liberados en la sangre mediante el sistema linfático. Los quilomicrones son transportados hacia el hígado donde es hidrolizado hacia retinol para poder ser embonados a sus proteínas enlazadoras (RBP) (Noy , 1984) y liberados en la sangre, donde las RBP se combinan con transtiretina (TTR). El complejo de la terna R-RBP-TTR sirve para transportar el retinol en la circulación sanguínea y liberarlo en los tejidos receptores. El BC es transportado por la vía linfática y temporalmente almacenado en el hígado, pero sólo circula en la linfa como una fracción de lipoproteína. Varios tipos de moléculas

en la sangre se dirigen hacia la membrana basal del folículo ovárico (Haliloglu *et al.*, 2002) tanto el betacaroteno como el retinol existen en el fluido folicular en proporción a las concentraciones de sangre. Aparte del acceso libre mediante difusión pasiva hacia el fluido folicular, existen procesos selectivos especializados con sus proteínas acarreadoras. Esto puede explicar en gran medida las diferencias en concentraciones entre el fluido folicular y el torrente sanguíneo (Brown *et al.*, 2003). La actividad de desdoblamiento del betacaroteno existe en las células de la granulosa bovina (Schweigert *et al.*, 1998), lo cual indica una conversión local de betacaroteno a retinol para su utilización a nivel folicular. Además de ello, el betacaroteno es acumulado en el cuerpo lúteo (Haliloglu *et al.*, 2002) el cual puede ser considerado como una fuente alternativa para los folículos. Eventualmente todas las formas activas de vitamina A se enlazan a sus receptores para activar los genes de transcripción y receptores.

3.6. BETACAROTENO EN ANIMALES

El inmerso interés científico en la vitamina A y los retinoides es demostrado por la gran cantidad de publicaciones científicas y biomédicas en los últimos diez años. Además, miles de científicos actualmente se encuentran inmiscuidos en revelar los secretos de este nutriente importante en la dieta de los animales. Aunque las principales disciplinas incluyen biología molecular y de desarrollo, dermatología, oncología, y salud pública, el rol potencial de los retinoides está comenzando a explorarse en todos los campos de la investigación científica. Aún existen muchos aspectos que son pobremente entendidos con respecto al metabolismo y mecanismos de acción del retinol, como el rol en la fisiología y patología celular.

Los carotenoides fueron antiguamente investigados por su importancia en la nutrición animal. Algunos estudios realizados a mediados del siglo pasado en animales, destacaban la importancia de conocer cómo eran sintetizados y cuales pudieran ser los mecanismos por medio de los cuales los animales aprovecharían su transformación hacia vitamina A, y los sitios donde era absorbido y establecer posibles rutas de asimilación. Experimentos iniciales claramente establecían la presencia de vitamina A en el hígado de ratas después de suplementar betacaroteno, y generalmente se denominaba la presencia de una enzima llamada “*carotenasa*” en el hígado, la cual sería la responsable de desdoblar el beta caroteno y convertirlo en vitamina A (Moore, 1929). Esta hipótesis no cumplió de lleno con las evidencias experimentales ya que algunos autores demostraron y presentaron evidencias de que la transformación de betacaroteno a vitamina A en ratas ocurre en el intestino delgado, con lo cual se establecieron los inicios para la experimentación en ese sentido.

Goodwin y Gregory (1948) posteriormente presentaron evidencias de que la conversión de caroteno en vitamina A en ovejas, cabras y conejos, sucede en el intestino delgado. Klosterman *et al.*, (1949), sugirieron que el betacaroteno es desdoblado durante el proceso de digestión y absorción en el caso de ovejas, además, Swick *et al.*, (1949) demostraron, que en el caso de cerdos, la vitamina A es convertida sobre las paredes intestinales. Stallcup y Herman (1950), determinaron que el beta caroteno administrado a vaquillas es convertido a vitamina A en el intestino delgado y en el hígado y que aparentemente esta conversión no se da en el plasma sanguíneo, además encuentran una diferencia entre razas, presentando las mayores tasas de

conversión en la raza Guernsey comparadas con Jerseys y Holsteins, sin encontrar una explicación a este fenómeno.

La función de la vitamina A en el proceso visual fue resuelto hace algunas décadas: el 11-cis retinol o los compuestos cercanos como el 11- cis 3 hidroxiretinal, funcionan como cromóforos de varios pigmentos visuales (Wald, 1968). Investigaciones iniciales demostraban que las deficiencias de vitamina A, y por otro lado el exceso de esta, dramáticamente cambia la diferenciación de las células epiteliales (Wolbach y Howe, 1925) y que los metabolitos del ácido retinoico *-trans* actúan como una poderosa fuente de señalización molecular en los cordados (Por ejemplo invertebrados, tunicados y lancetas, y los vertebrados). Un mecanismo desligado de la función visual de la vitamina A fue conocido hasta principios de 1987, por dos grupos independientes de investigadores, Giguere *et al.*, (1987) y Petkovich *et al.*, (1987) descubrieron los receptores nucleares específicos para todos los ácidos retinoicos *-trans*. Estos receptores son activados por los ácidos retinoicos de forma *-trans*, y regulan la expresión genética para los enlazadores de pequeñas secuencias de ADN cercanamente a los genes blanco. Además, estos experimentos demostraron claramente que muchas de las actividades biológicas de la vitamina A son mediadas por estos receptores, mecanismos adicionales a estas acciones comenzaron a descubrirse a partir de que éstos fueron identificados.

La vitamina A es esencial para la vida de todos los cordados. Tiene numerosas e importantes funciones incluyendo la visión, mantenimiento de tejidos y superficies epiteliales, competencia inmune, reproducción y desarrollo embrionario. En humanos, cuando la vitamina A no se ingiere

adecuadamente para cumplir las necesidades del cuerpo, las deficiencias clínicas son fallas oculares (xeroftalmia) y una generalizada resistencia a infecciones oculares. La deficiencia de vitamina A es un problema de salud pública, en más de ciento veinte países. En 1995 se estimaba que entre ciento cuarenta y doscientos cincuenta millones de niños en preescolar estarían en riesgo de deficiencias subclínicas de vitamina A, tres millones eran clínicamente deficientes, y más de un millón de muertes anuales en menores fue a consecuencias de la deficiencias de vitamina A (World Health Organization, 1995). El problema no es común en países altamente desarrollados.

El betacaroteno puede ser, sin embargo, un espejo de dos caras, ya que recientemente se sugiere que la ingesta marginalmente por encima de la dieta recomendada diaria es asociada a malformaciones embrionarias (Rothman *et al.*, 1995), además de que reduce la densidad mineral en huesos incrementando el riesgo de fracturas o malformaciones en el sistema óseo. Las clásicas señales de hipervitaminosis por betacaroteno pueden ocurrir en la piel, sistema nervioso, músculo esquelético, circulación y órganos internos, además en el feto, como consecuencia de la ingesta de medicamentos que contengan altas concentraciones de vitamina A (Hathcock *et al.*, 1990).

En experimentos dirigidos para conocer el efecto del beta caroteno en la superovulación de vacas se encontraron resultados positivos, las vacas adultas y las mayores dosis mostraron mayor calidad de embriones comparados con los animales jóvenes. De acuerdo con Sales *et al.*, (2008) El uso de beta caroteno combinado con tocoferol puede ser una alternativa de mejoramiento en la calidad de embriones en los procedimientos de súperovulación, utilizando vacas adultas, por lo

cual el tratamiento para vaquillas puede ser limitado, y asoció el efecto benéfico del beta caroteno a tres posibles rutas, 1) al efecto estimulador de la vitamina A sobre la enzima desdobladora de colesterol, 2) al incremento intrauterino de factores importantes asociados a el desarrollo inicial embrionario (Harney *et al.*, 1990); y 3) la formación de uniones GAP que pueden ser importantes para la coordinación la función lútea (Bilska *et al.*, 1996).

Algunos estudios aplicados en caninos para evaluar el efecto de la dosis sobre los niveles séricos de progesterona y estradiol demuestran la importancia de este elemento durante la etapa reproductiva. Animales suplementados con una dosis alta de betacaroteno (50 mg) presentaron los niveles más altos de estradiol en suero, dos días antes de la ovulación y las más altas concentraciones de progesterona durante los días 8 a 17 después del pico de ovulación, comparados con el grupo control, lo que sugiere una aceleración en el tiempo y tasa de la ovulación (Weng *et al.*, 2000). En el mismo estudio, las concentraciones de progesterona fueron bajas antes de la ovulación, pero se incrementaron rápidamente después del pico de ovulación durante los días 12 y 13 después del pico de ovulación. Por el contrario, el estradiol en plasma fue alto antes de la ovulación y decreció dramáticamente cerca del día seis después de la ovulación. Después de la liberación del ovulo, las células de la teca y granulosa del folículo experimentan la proliferación y la diferenciación para la formación de un cuerpo lúteo funcional.

El cuerpo lúteo produce la progesterona, la cual es crítica para el mantenimiento de la preñez, debido a esto, el cuerpo lúteo al igual que el útero, es altamente activo durante este momento ya

que la producción de hormonas esteroidales es mayor. Consecuentemente el betacaroteno pudiera servir como un protector lúteo contra el daño estructural y funcional de las especies reactivas de oxígeno y mediante este medio soportar la actividad esteroidogénica. La suplementación de betacaroteno promueve incrementos en las concentraciones séricas de progesterona y estradiol durante el ciclo estral, lo que sugiere una influencia importante del betacaroteno en la mejora reproductiva de los caninos.

Tracy *et al.*, (2004) utilizaron oocitos de bovino para evaluar el efecto de la suplementación de retinol durante el cultivo *in vitro* en la etapa de desarrollo hacia el estado de blastocitos. La administración de retinol durante el estado de maduración tuvo un efecto dependiente de la concentración. Con una concentración de 1 μ M de retinol no tuvo efecto sobre el desarrollo, mientras que 5 μ M tuvo una tendencia a mejorar el desarrollo del blastocito; por el contrario, a una alta concentración (10 μ M) no presentó algún cambio significativo sobre el desarrollo del embrión comparado con el grupo control. En estudios preliminares, altas concentraciones (100 μ M) fueron citotóxicos, mientras que la exposición de oocitos a bajas concentraciones mejoraba substancialmente el desarrollo del blastocito (Gómez *et al.*, 2003).

Ya que la mayoría de las transcripciones en el oocito ocurren antes de la maduración, durante el desarrollo preovulatorio, el cultivo *in vitro* no presenta la mayoría de esta actividad. Algunos inhibidores meióticos han sido usados como medios para la investigación de la transcripción en oocitos y ARNm *in vitro*. El tratamiento de oocitos enclaustrados en el *cumulus* con ácido retinoico 9-CIS durante el inactividad meiótica mejoró de manera importante el desarrollo de la

corteza granular, incrementando subsecuentemente el desarrollo del blastocito y el incremento del número total de células (Duque *et al.*, 2002). Gómez y colaboradores (2003) sugieren que la administración de retinol puede mejorar la calidad de ARNm, basados en la observación de que el ácido retinoico 9-CIS incremento el contenido de ARNm en oocitos en estado de inactividad en la meiosis. El contenido de RNAm de los oocitos tratados con ácido retinoico o etanol fue mayor en oocitos maduros que en los premadurados en presencia de ácido retinoico y después madurados. Tracy *et al.*, (2004), estudiaron el efecto de la administración de retinol sobre la maduración de oocitos in vitro y su relación con la concentración de oxígeno. La suplementación de retinol al medio de cultivo afectó positivamente, mejorando el desarrollo en el blastocito, cuando fue cultivado en un ambiente con alta concentración de O₂, una atmósfera de aproximadamente 20% de O₂ (aire con 5% de dióxido de carbono), por el contrario, no se obtuvieron resultados positivos en atmósfera con baja concentración de oxígeno (7% O₂, 5% CO₂ and 88% N₂). Previos estudios demostraban un efecto positivo de la administración de retinol durante la maduración de oocitos, además de ser una práctica común de laboratorio y que puede ser mejorada cuando se tiene una atmósfera con 20 % de oxígeno. Por lo tanto, estos datos indican que el retinol puede proteger al embrión del daño oxidativo de radicales libres, la cual ha sido identificado como una de las principales causas de la perdida embrionarias, especialmente in vitro (Guérin *et al.*, 2001).

Las células de mamíferos, incluyendo el oocito en sus etapas tempranas han generado algunos mecanismos para proteger contra el daño y el mantenimiento de balances apropiados de radicales

libres de oxígeno durante las reacciones de oxido reducción. Algunos antioxidantes presentes en el oocito, el embrión y su ambiente incluye vitamina A, C y E, piruvato, glutatión, (GSH), hypotaurina, taurina y sisteamina (Guérin *et al.*, 2001). Por su parte, las enzimas contra la oxidación en oocitos y embriones incluyen el cobre y zinc, superoxidasas, dismutasa, manganesa, superóxido dismutasa, glutatión superoxidasas, glutamil cistein sintetasa, glutatión reductasa, catalasa, entre otras. Lonergan *et al.*, (2003), demostraron que la expresión de algunas enzimas antioxidantes son fuertemente reguladas durante la maduración *in vitro* de oocito comparadas con la maduración *in vivo*, lo que indica que el ambiente controlado de crecimiento crea un estrés oxidativo y el oocito responde mediante la activación interna de mecanismos de defensa.

3.7. POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS EFECTOS POSITIVOS DE VITAMINA A SOBRE LA MADURACION CITOPASMÁTICA DE OOCITOS

Pocos investigadores quienes encontraron efectos positivos de la vitamina A y sus metabolitos sobre la maduración citoplasmática de oocitos en el ganado vacuno han sido capaces de dar una explicación fisiológica de estos efectos. Se puede enumerar algunos de los principales posibles mecanismos por los que se argumenta el efecto positivo de vitamina A.

3.7.1. Betacaroteno como un antioxidante

Recientemente se ha incrementado las evidencias del deterioro de los oocitos ocasionado por las especies de oxígeno radiactivas, especialmente cerca del periodo de maduración (Hashimoto *et al.*, 2000 y Oyawoye *et al.*, 2003). El Betacaroteno ha sido conocido ampliamente por su función como un antioxidante en la fase lipídica por la captación de radicales libres de oxígeno evitando la acción oxidativa sobre la célula (Sies y Stahl, 1995). Por otra parte, el betacaroteno extracelular en el fluido folicular que es incorporado en el fluido intracelular de los oocitos y células periféricas con el fin de proteger el ambiente contra la citotoxicidad de radicales libres, provocando la competencia y realzando la capacidad de los oocitos. El retinol no tiene la capacidad de desactivar los radicales libres de oxígeno por si mismo, por esto es necesaria la presencia de betacaroteno para la captación y desactivación de los radicales libres.

3.7.2. Retinol regula la expresión de los receptores a gonadotropinas en las células del cumulus y granulosa

Schweigert y Zucker (1988) encontraron que las concentraciones de retinol (pero no las de betacaroteno), en el fluido folicular se relacionaban con la calidad folicular, cuando las medias de concentración eran de 107, 90, 60 y 50 UI/dl la salud del folículo fue suavemente atrésico, atrésico, muy atrésico y altamente atrésico, respectivamente con cada valor encontrado. Estas concentraciones tenían una correlación alta con la concentración de estradiol intrafolicular. Esto sugiere que la vitamina A tiene una alto potencial para la modulación local del desarrollo folicular en su etapa de maduración final, incluyendo la maduración del oocito. El desarrollo folicular en

esta etapa es altamente dependiente de gonadotropinas de la pituitaria que regulan la diferenciación de las células de la granulosa (Hillier, 2001 y Hsueh, 1989). El ácido retinoico ha mostrado capacidad para suprimir la inducción de FSH mediante la inducción de los receptores a FSH (FSH-R) y los receptores a LH (LH-R) en células de la granulosa cultivadas in vitro (Xing y Sairam, 2002). Es difícil describir una conclusión específica sobre los posibles roles de la vitamina A en la maduración de oocitos mediante la referencia de resultados in vitro, ya que los receptores a LH son dependientes y procedentes de la activación de FSH y son considerados una acción pivotal en la última etapa de desarrollo y maduración así como la ovulación y la luteinización. Todos estos eventos ocurren de manera normal en el ciclo estral del ganado en la presencia de vitamina A en un ambiente natural dentro y fuera del folículo (Hillier, 2001). Sin embargo, bajo las condiciones de súperovulación o cultivo in vitro, sin la calidad fisiológica natural, se pueden dar altas concentraciones de gonadotropinas que pudieran inducir la adquisición aberrante de receptores a LH y FSH sin la dependencia natural y la función dependiente y pivotal que se tiene entre ambas gonadotropinas.

3.7.3. Inducción de midkine en el cumulus de las células de la granulosa

Midkine (MK) es uno de los factores de crecimiento y diferenciación enlazadores de la heparina reconocida por su alta relación en el aumento y la generación del fluido folicular (Ohshima *et al.*, 1994). Anteriormente se reportó que al añadir MK al medio de cultivo con cumulus bovino, aumenta la posibilidad de tener blastocitos sanos después de en crecimiento in vitro. Recientemente se ha encontrado que el ácido retinoico incrementa las concentraciones del RNA

mensajero de MK en células de la granulosa cultivadas in vitro (Minegishi *et al.*, 1996). Recientemente el tratamiento de COE bovinas con 9 cis ácido retinoico presenta un efecto altamente positivo sobre la maduración citoplasmática de oocitos asociado directamente con los incrementos de el RNA mensajero de MK (Gómez *et al.*, 2003). Además, se ha encontrado que el grado de apoptosis en el *cumulus* de las células CEO durante el cultivo in vitro disminuye mientras que aumenta la concentración de MK, por lo que se sugiere que además del ácido retinoico promueve la sobrevivencia celular mediante la activación de MK, la cual suprime directamente la apoptosis (Ikeda *et al.*, 2003). Es muy posible que el ácido retinoico promueva el crecimiento folicular y la maduración de oocitos mediante la producción de MK en las células del *cumulus* de la granulosa tanto in vitro como in vivo.

3.7.4. Supresión de la síntesis de ciclo oxigenasa por el ácido retinoico en las células del cumulus de la granulosa.

Las prostaglandinas (PG) son generadas a partir del ácido araquidónico a través de la vía de las ciclooxigenasas (COX). Las ciclo oxigenasas tienen dos isoformas, cox-1 y cox-2. El gen de la cox-1 es fuertemente expresado en la mayoría de los tejidos y células y está implicado en las funciones propias de la síntesis de prostaglandinas. Por otro lado, cox-2 es un gen de respuesta inmediata el cual es particularmente activado por los factores mitogénicos y citocinas (Richards, 1997). En los folículos preovulatorios, el RNAm del cox-1 y sus proteínas están presentes a bajas concentraciones y de manera constante en la célula de la teca, mientras que la expresión de la cox-2 se presentan en la células murales de *cumulus* de la granulosa y dinámicamente se

incrementan en el periodo preovulatorio, indicando que la cox-2 es una fuente exclusiva de la prostaglandinas en folículos preovulatorios (Nuttinck *et al.*, 2002). Hay una fuerte evidencia de que el sistema cox-2/PG está involucrado en varios aspectos de la diferenciación final de los folículos. Generalmente es aceptado que las PG son sintetizadas por la cox-2 y juegan un rol importante en la ovulación en bovinos, basados en el hecho de que la inhibición de cox-2 durante el periodo preovulatorio evita la ovulación, además se ha demostrado en otras especies de mamíferos (De Silva y Reeves, 1985; Algire *et al.*, 1992). De acuerdo con estos conceptos, la expresión de cox-2 es inducida en las células murales de la granulosa por el pico preovulatorio de LH en yeguas y vacas, además, LH regula el incremento del RNAm y la aparición de sus proteínas en cada uno de estos mamíferos aproximadamente diez horas antes de la ovulación, sugiriéndose que PG es una parte esencial en la programación del “reloj” ovulatorio (Liu *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado que las células del *cumulus* producen cox-2 durante el cultivo in vitro (Nuttinck *et al.*, 2002) altamente dependiente del tiempo las cuales incrementan de manera importante las concentraciones de PGE₂ y PGF_{2a} en el medio de cultivo.

De la misma manera, las funciones de PG son requeridas para la función del proceso de ovulación, ya que las concentraciones de PG benefician la maduración de oocitos, una excesiva o prolongada exposición a las concentraciones de PG durante el periodo de maduración puede ser determinante para la maduración citoplasmática de los oocitos. De hecho, 50 y 100 ng/mL de PGF_{2a} agregadas al cultivo in vitro de oocitos suprimen directamente la transcripción de cox-2 mediante los mecanismos dependientes de receptores (Yang y Frucht, 2001; Subbaramaiah *et al.*,

2002). Estas moléculas pueden contribuir a la apropiada síntesis de PG mediante la supresión de la expresión genética de cox-2 y como consecuencia ayudar a la maduración citoplasmática de los oocitos de manera natural y en medios de cultivo.

3.7.5. Supresión de la síntesis de óxido nítrico (ON) por el retinol en las células del cumulus de la granulosa y del oocito

El óxido nítrico (ON) es uno de los radicales libres que median gran variedad de funciones celulares (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992). El ON se sintetiza a partir de la L-arginina mediante la ON sintetasa (ONS), mediante tres isoformas que han sido identificadas: endotelial (eONS), sintetasa neuronal (nONS) e inducible (iONS) (Mungrue, 2003). La expresión de RNAm de las eONS y la iNOS fue detectada en células de la granulosa de folículos preovulatorios durante la inducción de la ovulación de equinos y humanos (Yamagata, 2002). Además, la eONS ha sido detectada en células de la granulosa y oocitos de porcinos (Grasselli, 2001, Hattori, 2001). Los oocitos, embriones y células de la granulosa que demuestran producción de ON, sugieren un importante rol fisiológico del óxido nítrico en la ovulación, maduración de los oocitos y el desarrollo embrionario. Sin embargo, los efectos reportados de la presencia de ON en la maduración de oocitos es muy compleja y difícil de interpretar. Algunas publicaciones expresan que la regulación de la generación de ON en cultivos *in vitro* afecta la maduración de los oocitos y el desarrollo de embriones (Bu *et al.*, 2003). Lim y Hansel (1998) apuntan que los embriones bovinos no pueden producir cantidades tóxicas de ON, lo cual indica que éstos no afectan el desarrollo del

embrión y que además el ON producido no es derivado de estas células, presumiendo la entrada externa de ON.

Se ha sugerido que el ácido retinoico puede regular el sistema ON/ONS en las células del *cumulus* de la granulosa y afectar la maduración citoplasmática de los oocitos de bovinos ya que el ácido retinoico inhibe la expresión de iONS a través de los receptores de ácido retinoico alfa (Sirsjo *et al.*, 2000). Además, se ha propuesto que el ácido retinoico inhibe fuertemente la expresión del RNAm del eONS y la síntesis de ON en oocitos maduros de porcinos (Hattori *et al.*, 2002). Hattori *et al.*, (2001) propusieron un modelo en el cual los oocitos liberan ON como una señal para suprimir la diferenciación de las células del cumulus de la granulosa, cuando éstas adquieren los receptores de LH, lo cual deriva en una disminución de ON, y además, suprime la estimulación de FSH. Este posible mecanismo es razonable para la apropiada programación de la diferenciación de las células de la granulosa, y además, posiblemente involucre algunos periodos de pre maduración. Sin embargo, si esto se da, el periodo de acción de los ON estaría limitado al periodo de inactividad mitótico antes del estado de crecimiento.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área experimental, condiciones ambientales, animales y alimentación

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo (URUZA-UACH, 26° LN, 103° LO, a 1,117 msnm). El clima es del tipo cálido seco con oscilaciones térmicas extremas. Los promedios anuales de precipitación y temperatura son 217.1 mm y 22.3°C, respectivamente. Cabras prepúberes (n=17) de 3 meses de edad con un encaste mínimo de $\frac{3}{4}$ Saanen- Alpina $\frac{1}{4}$ Criollo, recibieron una dieta para cubrir el 100% de sus requerimientos nutricionales ajustados al peso corporal (NRC, 1998). Tanto el PC como la condición corporal (CC) fueron registradas semanalmente previo a su alimentación. La CC se evaluó mediante palpación dorsal y costal utilizando una escala de 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda). Las cabras fueron alimentadas dos veces al día: por la mañana (0700) heno de alfalfa (14% PC, 1.14 ENm Mcal kg⁻¹) y ensilado de maíz (8.1% PC, 1.62 ENm Mcal kg⁻¹), y por la tarde (1800) maíz rolo (11.2% PC, 2.38 ENm Mcal kg⁻¹) bajo condiciones naturales de luz de junio a noviembre.

4.2. Diseño de tratamientos

A inicios de junio, las cabras fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos experimentales: 1) betacaroteno (**BB**, n=9), y 2) Control, (**CC**, n=8). Las cabras-BB recibieron una suplementación de 200 mg cabra⁻¹ d⁻¹ de betacaroteno (Syntex, SA de CV) durante todo el período experimental. Las

cabras de ambos grupos tuvieron libre acceso a agua, sales minerales, sombra, así como a una dieta basal consistente de alfalfa (14% PC; 1.14 Mcal kg ENm), y ensilaje de maíz (8.1% PC; 1.62 Mcal kg ENm).

4.3. Muestreo de sangre

De junio 7 a noviembre 1 se realizaron muestreos de sangre (1 vez por semana) del total de las cabras en estudio (n=17). Las muestras sanguíneas se colectaron mediante venopunción de la yugular utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, USA) y tubos colectores Vacutainer de 10 mL (Corvac, Sherwood Medical, St Louis, MO, USA). Una vez centrifugadas las muestras (1,500 x g, 15 min), cada muestra de suero con su réplica se almacenaron en tubos de polipropileno a -4°C. En total se colectaron 16 muestras por cabra; 144 (BB) y 128 (CC), para un total de 272 muestras de suero sanguíneo.

4.4. Cuantificación de progesterona en suero, criterio para evaluar la actividad reproductiva

Las muestras de suero se evaluaron por duplicado por su contenido de progesterona (P4), mediante radioinmunoanálisis (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). La prueba está modificada y validada para el uso en suero de rumiantes (Schneider, 1996). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 0.2 pg mL⁻¹. Los análisis hormonales se realizaron en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Nuevo México, E.U.A. Cabras con dos muestras consecutivas de suero con niveles séricos de P4 $\geq$ 1 ng mL⁻¹ fueron clasificadas

como reproductivamente activas, considerando en dicho momento el inicio de la pubertad (Cushwa, 1992).

4.5. Cuantificación de insulina

Las muestras de sangre fueron analizadas y evaluadas durante el muestreo mediante radioinmunoanálisis para su contenido de insulina, de acuerdo a los procedimientos señalados por Berrie *et al.*, (1995), con un coeficiente de variación intra ensayo de 9.8 % y un límite de detección de 0.2 ng/mL. Todos los análisis hormonales fueron realizados en el laboratorio de endocrinología del departamento de Ciencia Animal, de la Universidad Estatal de Las Cruces, Nuevo México, EUA.

4.6. Análisis estadísticos

Los pesos corporales (PC) y la condición corporal (CC) fueron evaluados mediante un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con dos tratamientos de 17 unidades experimentales (BB y CC) (Snedector y Cochran, 1967). Las concentraciones séricas de insulina fueron evaluadas mediante un ANOVA con un diseño completamente al azar, con un arreglo de parcelas divididas para muestras repetidas en el tiempo (Gill y Hafs, 1971). El efecto de tratamiento fue incluido en la parcela mayor utilizando el término de cabra dentro de tratamiento para calcular el error. El tiempo de muestreo y la interacción del tratamiento por tiempo fueron incluidos en la parcela menor, utilizando el cuadrado medio residual para probar sus diferencias. En el evento de un efecto significativo, la separación de medias consideró el procedimiento PDIFF,

para probar sus diferencias mediante el procedimiento LSMEANS usando el comando GLM (PROC GLM) del SAS (Littell *et al.*, 1991).

El porcentaje de cabras mostrando actividad ovárica se comparó con un análisis de j^2 . El análisis estadístico de los datos consideró un procedimiento estadístico para tablas de frecuencia analizados por ji-cuadrada.

4.7. Modelos estadísticos

Modelo I:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Y_{ij} = La variable respuesta PV y CC de la j-ésima cabra con el i-ésimo tratamiento.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento; $i = 1, 2$ (BETA, CONT).

E_{ij} = Error experimental de la j-ésima cabra asociado al i-ésimo tratamiento ($\sim$ NID, $\mu=0, \sigma^2 e$).

Para evaluar el comportamiento de las concentraciones séricas de insulina (INS), se uso el siguiente modelo:

Modelo II:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + ID_{j(i)} + t_k + T_{(ik)} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = Concentración de INS (ng mL⁻¹) del i-ésimo tratamiento medida en la j-ésima cabra

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento, donde i = 1, 2 (BETA, CONT)

$ID_{j(i)}$ = Efecto de la j-ésima cabra en el i-ésimo tratamiento (ERROR A)

t_k = Efecto del k-ésimo tiempo de muestreo, donde k = 1,..., 20

$T_{t(jk)}$ = Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento dentro del k-ésimo tiempo de muestreo

E_{ijk} = Error experimental del i-ésimo tratamiento mas la j-ésima cabra mas el k-ésimo tiempo de muestreo (~ NID, $\mu=0$, $\sigma^2 e$)

Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS (Littell *et al.*, 1991). Los valores reportados son las medias de mínimos cuadrados $\pm$ el error estándar de la media.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados

5.1.1 Peso corporal y condición corporal

En el Cuadro 1 se presentan las medias de mínimos cuadrados para peso corporal (PC, kg) y condición corporal (CC, unidades) al inicio (junio 7) y al final (noviembre 1) del período experimental en cabras peripúberes (n=17) suplementadas con betacaroteno (BB) o Control (CC). El peso corporal promedio al inicio del período experimental fue de 16.65 ± 1.04 kg, llegando a un peso final promedio de 23.47 kg, la condición corporal promedió 3.31 ± 0.12 unidades; durante todo el período experimental no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre los grupos experimentales para las citadas variables.

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para peso corporal (PC, kg), y condición corporal (CC, unidades) durante junio (1), Julio (2), agosto (3) y septiembre (4) en cabras prepúberes suplementadas con betacaroteno (BETA) o control (CONT) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera

Tratamientos	BETA	CONT	P	EE ¹
PC1	17.29	16.13	0.69	1.04
PC2	20.33	19.86	0.94	1.12
PC3	21.17	20.33	0.77	0.87
PC4	24.16	22.79	0.45	0.80
CC1	3.34	3.17	0.38	0.12
CC2	3.09	3.06	0.89	0.11
CC3	3.18	2.93	0.30	0.11
CC4	3.54	3.43	0.40	0.11

¹ EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados

5.1.2. Concentraciones séricas de insulina y porcentaje de cabras con actividad ovárica

El Cuadro 2 muestra las medias de mínimos cuadrados para porcentaje de cabras mostrando actividad ovárica (pubertad) y las concentraciones séricas de insulina en las cabras tratadas durante el período experimental entre junio y noviembre. El porcentaje de cabras mostrando el inicio de la actividad reproductiva (pubertad) determinada por los niveles séricos de P4, no difirió ($P>0.05$) entre los tratamientos. De la misma manera, no hubo diferencias significativas entre tratamientos con respecto a las concentraciones séricas de insulina ($P>0.05$)

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para las concentraciones séricas de insulina y el porcentaje de cabras mostrando actividad ovárica (pubertad, % ¹) durante el período experimental junio – noviembre, (n=17) suplementadas con betacaroteno (BB) o control (CC) en la Comarca Lagunera

Tratamientos	BB	CC	P	EE ²
PUBERTAD ¹	44.4	25.0	0.43	0.17
INSULINA	1.4	1.2	0.15	0.09

¹ El inicio de la pubertad consideró la existencia de dos o más muestras consecutivas de suero con valores de progesterona mayor o igual a 1 ng mL⁻¹.

² EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados.

El Cuadro 3 muestra las medias de mínimos cuadrados para las concentraciones de insulina y sus interacciones de acuerdo al tiempo de muestreo y el tratamiento, durante los meses de junio a noviembre. No hubo efecto de tratamientos para el nivel de insulina (Cuadro 2), sin embargo, se observó una diferencia significativa entre tratamientos durante el último tercio del muestreo en

favor del grupo BB, alcanzando un máximo de 2.098 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en el muestreo 4 correspondiente a septiembre. De la misma manera hay una alta interacción entre las medias al inicio del periodo de muestreo mientras que a la parte final del periodo de muestreo, las medias del grupo betacaroteno incrementan de manera sustancial.

Cuadro 3. Interacción entre medias para las concentraciones séricas de insulina (INS) mediante mínima diferencia significativa (LSD) de acuerdo al tiempo de muestreo (TIEMPO) durante el período experimental junio – noviembre, en cabras peripúberes (n=17) suplementadas con betacaroteno (BB) y Control (CC) en la Comarca Lagunera

TIEMPO	BB	CC	EE
1	0.61 ^E	0.76 ^{DE}	0.182
2	0.93 ^{CDE}	1.07 ^{CDE}	0.182
3	1.16 ^{DC}	1.12 ^{CD}	0.182
4	2.09 ^A	1.35 ^{BC}	0.182
5	1.73 ^{AB}	1.37 ^{BC}	0.182
6	1.69 ^{AB}	1.39 ^{BC}	0.182

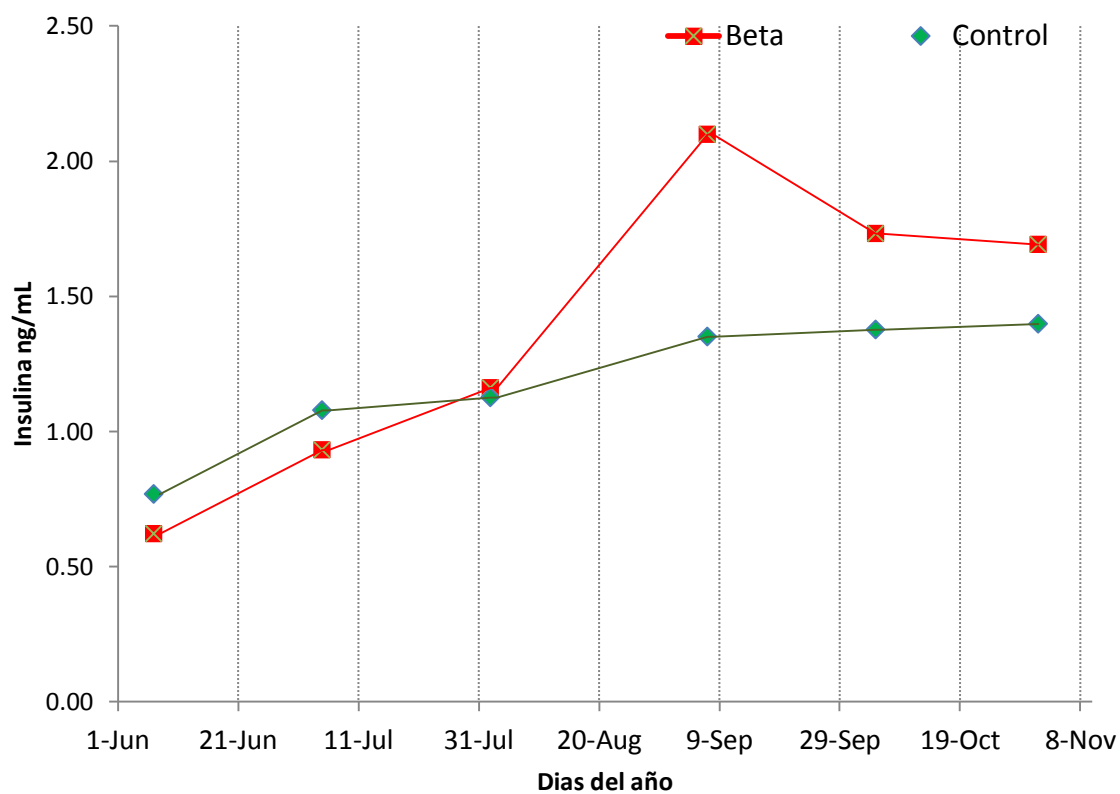
BB=Grupo Beta caroteno, CC= Grupo Control EE=Error Estandar

^{A,B,C,Dy E} Interacciones entre tratamientos y tiempos de muestreo

Mínima diferencia significativa (LSD) $P \leq 0.05$

Las interacciones entre los tiempos de muestreo sobre las concentraciones séricas de insulina durante el periodo experimental demuestran que existió una diferencia significativa ($P < 0.05$) para los tiempos de muestreo 4, 5 y 6 entre tratamientos, correspondientes a los meses finales del experimento septiembre, octubre y noviembre en comparación con los meses iniciales del experimento y a favor del grupo BB (Grafica 1).

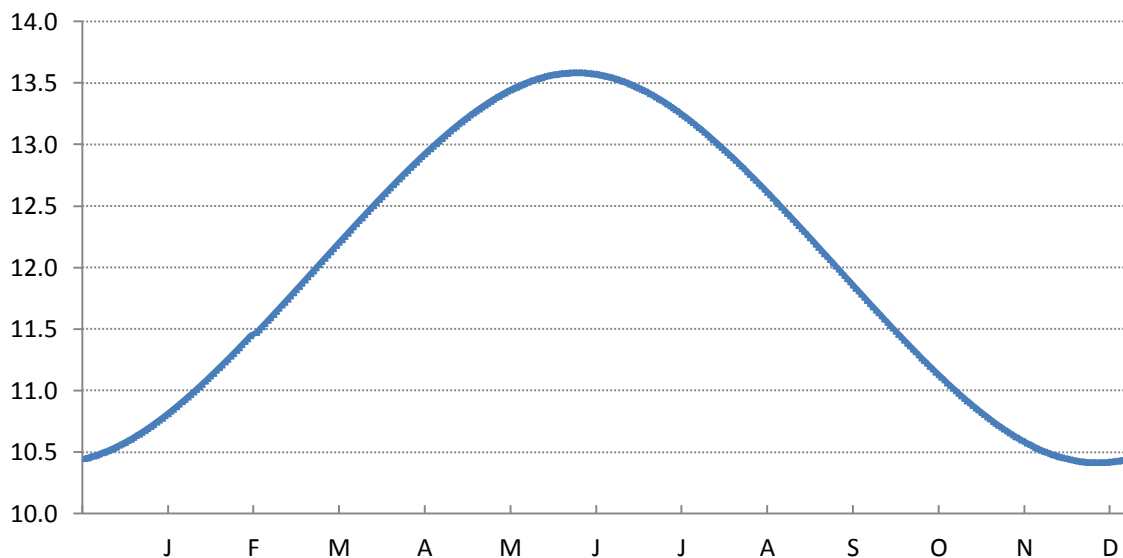
La suplementación de betacaroteno afectó el patrón de secreción de insulina con respecto al tiempo ($P<0.05$) a partir del tercer muestreo (Grafica 1), mostrando un máximo en el muestreo cuatro (septiembre).



Grafica 1. Concentraciones séricas de insulina a través del tiempo de muestreo para el grupo control (CONT) y betacaroteno (BETA) durante el periodo experimental

5.1.3. Fotoperiodo, concentraciones séricas de insulina y peso corporal durante el periodo experimental

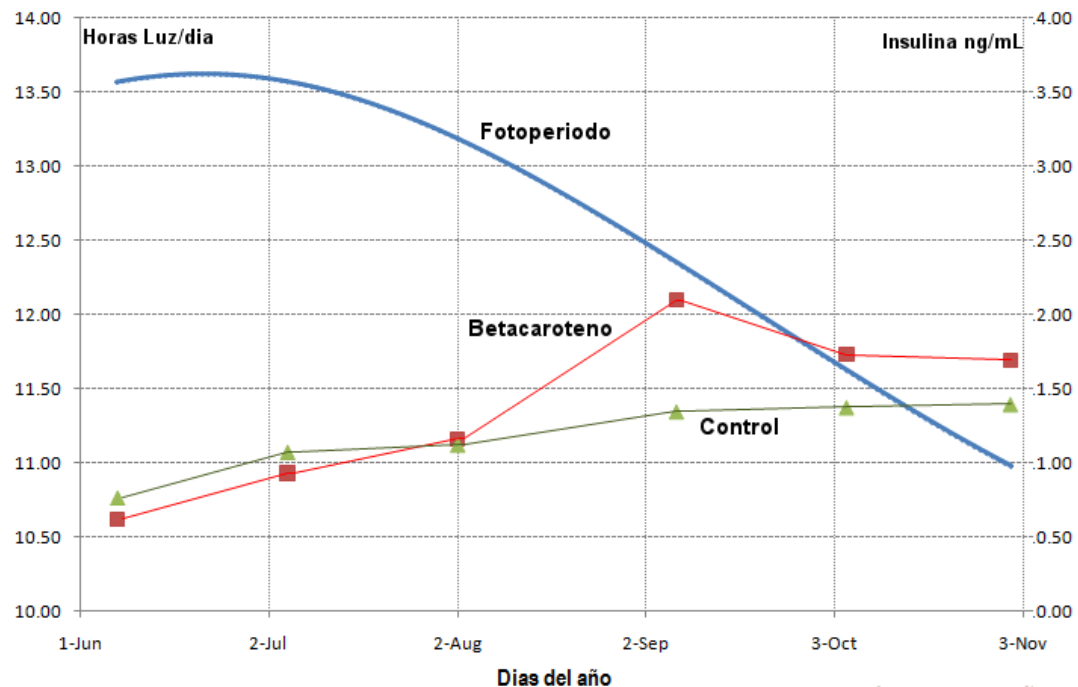
La Gráfica 2 muestra la curva de fotoperiodo en la región del experimento, el máximo nivel de luz diario se presenta aproximadamente desde el 16 al 26 de junio con valores de 13.6 horas diarias, mientras que los valores mínimos se presentan durante diciembre entre los días 15 al 23 y con valor de 10.3 horas de luz diaria. La diferencias durante el periodo de cambio entre fotoperiodo largos hacia cortos anualmente estriba entre las tres horas de luz.



Grafica 2. Fotoperiodo anual en la región de Bermejillo, Durango. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo 26° LN, 103° LO (1,117 msnm)

La grafica 3 muestra la interaccion entre el efecto del fotoperiodo sobre las actividad reproductiva, expresada en los niveles séricos de insulina, a medida que la longitud del dia disminuye, las concentraciones de insulina tienden a aumentar, aún cuando estadísticamente no existió

diferencia entre los tratamientos, el efecto se observó en el tiempo de muestreo para las concentraciones de insulina (Cuadro 4) entre el inicio y la parte final del muestreo.



Grafica 3. Concentraciones séricas de insulina, fotoperiodo anual para el grupo Control (CONT) y betacaroteno (BETA) durante el periodo experimental.

El Cuadro 4 resume las correlaciones entre las concentraciones séricas de insulina, peso corporal y fotoperiodo para los tratamientos aplicados, observando una alta correlacion entre el peso corporal y las concentraciones séricas de insulina en ambos grupos, con un mayor grado de asociacion positiva para el grupo control ($P=0.001$). Se observa tambien una clara asociacion negativa (-0.843) entre el fotoperíodo y las concentraciones séricas de insulina para el grupo control ($P=0.035$), mientras que se establece una alta asociacion positiva entre peso corporal y los niveles séricos de insulina. Esto es, conforme disminuye el la longitud del día (fotoperiodo),

aumentan las concentraciones séricas de insulina, al mismo tiempo que se incrementa la ganancia de peso (Grafica 3).

Cuadro 4. Correlaciones entre las concentraciones séricas de insulina (INS), el peso corporal (PC) y el Fotoperiodo durante el período experimental Junio – Noviembre, en cabras peripúberes (n=17) suplementadas con Betacaroteno (Beta) o Control (Control) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera

	Ins_Beta	Ins_Contr	PC_Beta	PC_Contr	Fotoperi
Ins_Beta	1	.921**	.957*	.909	-.764
		.009	.043	.091	.077
Ins_Contr		1	.994**	1.000**	-.843*
			.006	.000	.035
PC_Beta			1	.990**	-.892
				.010	.108
PC_Contr				1	-.821
					.179
Fotoperiodo					1

** P< 0.01 altamente significativo

* P< 0.05 significativo

5.2. Discusión

El presente trabajo planteó como hipótesis que la suplementación con betacaroteno en cabras prepuberes y bajo condiciones de fotoperíodo decreciente, promueve la expresión de mecanismos fisiológicos extra e intra ováricos que genera una activación del crecimiento folicular, dando inicio al proceso ovulación-luteogénesis e incremento en la secreción de progesterona, y en consecuencia, el inicio de la pubertad, acompañado de incrementos en los niveles séricos de insulina. Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, la hipótesis planteada se acepta parcialmente, ya que aunque no hubo diferencias entre tratamientos respecto al porcentaje de cabras mostrando el inicio de pubertad, se observaron mayores concentraciones séricas de insulina en el grupo suplementado con betacaroteno.

En rumiantes, el betacaroteno es tomado principalmente de los forrajes, de donde pasa a la linfa sanguínea en forma de quilomicrones o esteres de retinol para ser almacenado en el hígado, de ahí se distribuye a los principales sitios de utilización, uno de los principales sitios de almacenamiento es en los oocitos, en el fluido folicular, donde las concentraciones son proporcionales a las concentraciones sanguíneas, y el cumulus de las células de la granulosa donde promueve su función en la maduración de oocitos (Ikeda *et al.*, 2005).

Una de las principales funciones del betacaroteno es la de potente antioxidante, especialmente en tejidos donde hay bajos niveles de presión de oxígeno (Burton e Ingold, 1984). Como un antioxidante, el betacaroteno protege las células contra el daño de especies reactivas de oxígeno, que son producidas por las células durante el metabolismo normal y mayormente cuando la célula

se somete a estresores químicos inducidos por el ambiente. Durante la pubertad, las células neurales comienzan su funcionamiento con la secreción de GnRH, el betacaroteno pudiera actuar a este nivel protegiendo el proceso trans sináptico de la oxidación natural.

De la misma manera, el Acido Retinoico promueve la expresión de genes a nivel del sistema nervioso (Hox -3, -4 y -6) que ayudan a la regeneración de las células neurales (Schubert *et al.*, 2004), a este nivel el betacaroteno pudiera promover la activación de las neuronas GnRH y la activación del sistema reproductivo. Por otra parte, el Acido Retinoico induce la rediferenciación y la apoptosis en las células con adenocarcinoma (Tarek *et al.*, 2007), lo que sugiere a la apoptosis como un evento de renovación celular que ayuda a la regeneración de tejidos afectados por células cancerosas y pudiera estar relacionado con el mantenimiento de las concentraciones de insulina como una hormona metabólica secretada por el páncreas. Todos estos estudios revelan el efecto del betacaroteno en la fisiología celular lo cual nos permitiría intuir que tiene efecto en el proceso de pubertad, además de ser importante a nivel folicular, que pudiera afectar a nivel de las vías de señalización neurales y tanto en la secreción de progesterona como la liberación de GnRH (Figura 5). Otra de las evidencias del efecto del betacaroteno sobre el eje reproductivo es su funcionamiento en la maduración de oocitos (Ikeda *et al.*, 2005), los cuales a su vez desencadenan la secreción de estradiol por la vía de señalización de retroalimentación negativa de estradiol, como principal reactivador del ciclo reproductivo después de cada ciclo estral (Pelletier y Ortavant, 1975) mediante el cual pudiera estar afectando en conjunto la activación de la pubertad.

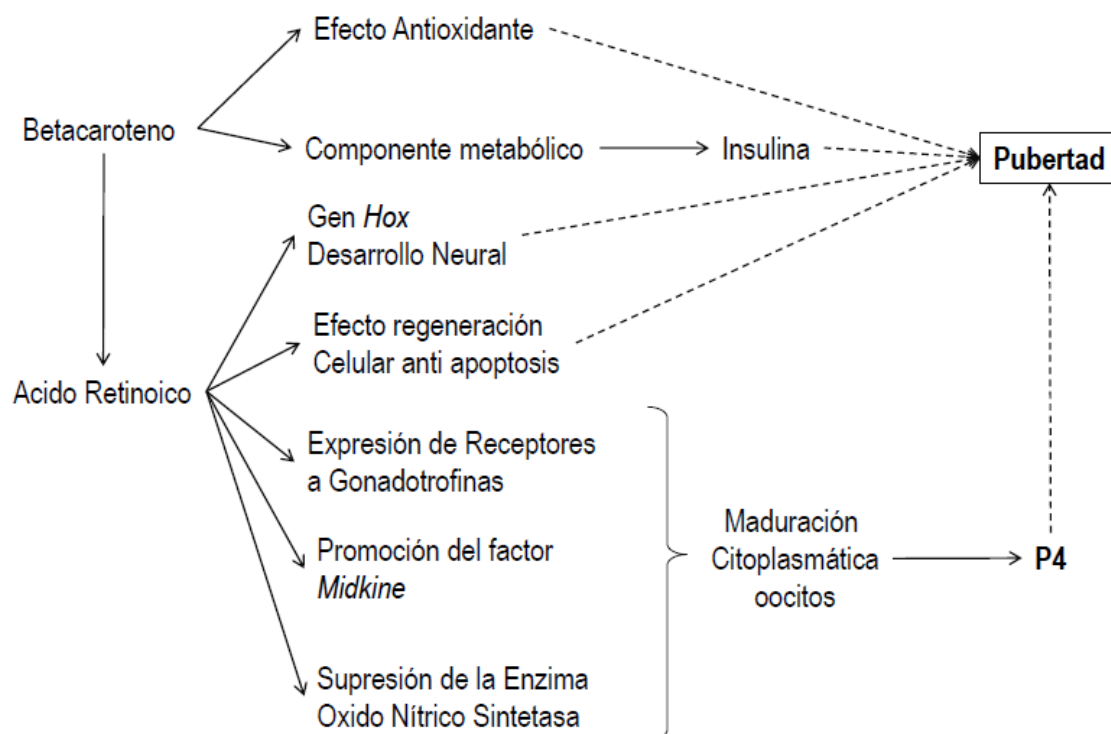


Figura 5. Posibles mecanismos fisiológicos y rutas en las cuales el betacaroteno y sus metabolitos pudieran afectar la pubertad

5.2.1 Peso corporal y condición corporal

Algunas de las variables más discutidas en investigaciones anteriores en relación al inicio de la pubertad son el peso corporal, la condición corporal y edad. Sakurai *et al.*, (2004) concluyeron que las cabras nativas en Japón, inician la pubertad hacia las 27 semanas de edad cuando alcanzan un peso corporal promedio de 12.2 kg. Estudios en el área de Zacatecas, México (22° 58' LN y 102°30') por Escobar Medina (2004), reporta el inicio de la pubertad a edades hasta de 4 meses de edad. En el presente estudio se utilizaron cabras nacidas en marzo con un peso promedio durante el experimento de 20.06 kg y un peso al final del experimento de 24.16, lo cual es consistente con lo reportado previamente, aunque las cabras utilizadas en nuestro estudio

tenían un alto encaste a grupos Alpino-Saanen, los cuales tienden a ser mas estacionales que las cabras criollas de la region. En estudios realizados en animales silvestres, demuestran que la actividad reproductiva está más relacionada con el peso corporal y la condicion corporal. La condicion corporal en nuestro estudio no difirió entre tratamientos; en promedio se observó una condicion buena, que equivale a la definicion aceptable dentro del parametro, entre 3 y 4 unidades.

5.2.2. Concentraciones séricas de insulina y porcentaje de pubertad

Bruning *et al.*, (2000) encontraron importantes conexiones entre las vías de señalización del cerebro y los centros reproductivos modulados por la insulina, proponiendo al menos dos posibles mecanismos mediante los cuales la insulina pudiera regular el eje reproductivo. Una relacionada directamente con la leptina, ya que se encontró alta correlación entre las concentraciones de leptina e insulina, lo que puede modificar la secreción de LH. Alternativamente, se propone que la expresión de los receptores a insulina sobre las neuronas productoras de GnRH pueden mediar la síntesis o secreción de esta hormona. Además de esto, las neuronas hipotalámicas presentan una alta afinidad a IGF-2, lo cual induce la liberación de GnRH (Olson *et al.*, 1995)

La insulina es considerada como una de las señales metabólicas que afectan directamente la secreción pulsátil de GnRH y LH en rumiantes (Hileman *et al.*, 1990). Del mismo modo, está correlacionada positivamente con el estatus nutricional que a su vez actúa centralmente para

estimular el pico y la liberación pulsátil de LH (Studer *et al.*, 1993). Steiner (1987) reportó un rol preponderante de esta hormona en el inicio de la pubertad en primates, además de ello, las concentraciones séricas de insulina incrementan antes de la pubertad en humanos (Hindmarsh *et al.*, 1988). Por su parte, Sakurai *et al.*, (2004) determinaron que las concentraciones de insulina tienden a elevarse después del inicio de la pubertad en cabras, suponiendo una demanda de “combustible” metabólico para la maduración sexual que se incrementa una vez iniciada la etapa reproductiva. Sin embargo, dicho escenario fisiológico no se observó en nuestro estudio.

De la misma manera, se propone que la vitamina A afecta positivamente la maduración citoplasmática de las células de los oocitos en desarrollo, suprimiendo algunos factores celulares dependientes del ácido retinoico, como la expresión de receptores a gonadotrofinas, la ciclooxigenasa-2 y la óxido nítrico sintetasa; por otro lado, el betacaroteno actúa positivamente al proteger las células de un daño ocasionado por el efecto de radicales oxidantes mediante un efecto natural antioxidante (Shuntaro *et al.*, 2005). Kawashima *et al.*, (2008) probaron que las concentraciones de betacaroteno durante el período periparto difieren entre vacas ovulatorias y anovulatorias en la primera oleada folicular postparto, reportando que la concentración de betacaroteno decrecía entre la tercer semana preparto y la primera posparto en vacas ovulando. Dichas investigaciones proponen un efecto significativo del betacaroteno sobre la reproducción, y específicamente en la maduración de folículos, además, tanto el betacaroteno como el retinol se encuentran en el fluido folicular en proporción a las concentraciones sanguíneas locales lo que

indica una gran importancia de este compuesto en los procesos fisiológicos normales del sistema gonadal.

En el presente estudio, sin embargo, la suplementación de betacaroteno no afectó un inicio más temprano de la pubertad, hasta el momento en que se finalizó el muestreo dentro del período experimental. Sin embargo, las concentraciones séricas de insulina se incrementaron en las cabras del grupo Beta a partir del último tercio del período experimental, aunque dicho patrón de secreción no se relacionó con un inicio más temprano de la pubertad.

Schweigert y Zucker (1988) encontraron que las concentraciones de retinol en el fluido folicular están altamente correlacionadas con el estradiol folicular, sugiriendo que la vitamina A tiene un alto potencial para la modulación local del desarrollo folicular mediante estradiol. En el mismo sentido, el estradiol es el principal activador propuesto para desencadenar el sistema de retroalimentación negativa que activa la reproducción después de los periodos de anestro estacionales provocados por la acción del fotoperiodo. Sin embargo, en nuestro estudio la suplementación oral de betacaroteno no promovió cambios en los patrones de comportamiento sexual temprano, aun cuando no se analizó el patrón de secreción de estradiol.

5.2.3. Fotoperiodo, concentraciones séricas de insulina y peso corporal durante el periodo experimental

Según Delgadillo (2004), las cabras del norte de México nacidas entre enero y mayo, inician su etapa reproductiva entre septiembre y diciembre del mismo año de nacimiento, con un

pronunciado efecto de estacionalidad, y una gran influencia del mes de nacimiento con respecto al inicio de la pubertad. Así, las cabras que nacen después del mes de mayo, prolongan su estacionalidad hasta el siguiente año, haciendo más largo el periodo antes del inicio de la pubertad. Un estudio realizado por Madani y Rahal (1988), con cabras en Libia (32° 56" N) las cabras nacidas después de enero, llegaron a su edad sexual madura, en promedio, a las 27 semanas con un peso corporal de 22 kg; por su parte, Deveson *et al.*, (1992) determinó que las más altas concentraciones de testosterona en machos caprinos inician a las catorce semanas de edad cuando nacen durante el periodo de otoño. Las cabras utilizadas en nuestro estudio habían nacido en marzo, llegarían a la pubertad aproximadamente a finales de septiembre, lo cual coincide con los resultados publicados por los anteriores investigadores. Sin embargo, el inicio de la pubertad fue en promedio a 20 semanas de edad con un peso corporal promedio de 23.5 kg, una de las diferencias contra los anteriores estudios es el grupo genético, lo que además sostenía nuestra hipótesis, ya que las razas encastadas con Saanen y Alpina son de gran tamaño y con una marcada estacionalidad reproductiva (Chemineau *et al.*, 1992).

Álvarez (1996) reportó que la suplementación alimentaria no acelera el reinicio de la actividad ovárica posparto en ovejas del trópico de México. En ambos trabajos se sugirió que el fotoperiodo podría ser el principal factor que regula el reinicio de la actividad ovárica posparto. En nuestro estudio, la suplementación de betacaroteno no provocó diferencias que pudieran evidenciar el efecto de la suplementación sobre una detonación más temprana de la pubertad, considerada como la activación inicial de la reproducción.

De acuerdo con Chemineau *et al.*, (2008) las cabras son afectadas por el fotoperiodo, inician su periodo reproductivo cuando se da el cambio de días largos a cortos, con lo cual, en la región de Bermejillo Durango (26 °LN, 103° LO, 1,117 m de altitud), iniciaría a partir de julio y se marcaría de manera pronunciada en de septiembre a enero, cuando finaliza el periodo de días largos e inicia los días cortos. De la misma manera, durante este periodo de tiempo se daría la acumulación de melatonina que a su vez activa el eje reproductivo.

VI. CONCLUSIONES

- La suplementación de 200 mg de betacaroteno, vía oral y una vez por día en cabras peripuberales con encaste $\frac{3}{4}$ Saanen-Alpino $\frac{1}{4}$ criollo, bajo fotoperiodo (Junio-Noviembre, 26° LN) no promovió un inicio más temprano de la pubertad considerando las concentraciones séricas de progesterona como marcador reproductivo.
- La suplementación de 200 mg de betacaroteno vía oral, una vez al día promovió un incremento en los niveles de insulina durante el último tercio del periodo experimental, los cuales no influyeron de manera positiva en un establecimiento mas temprano de la pubertad.
- Existió una correlación positiva en el grupo suplementado entre las concentraciones séricas de insulina, ganancia de peso y disminución del fotoperiodo, aun cuando este comportamiento no denotó diferencia con respecto al inicio de la pubertad.
- Se recomienda establecer un protocolo de muestreo de insulina y suplementación de betacaroteno mas extenso en el tiempo con el fin de conocer el patrón de secreción de insulina durante el cambio de fotoperiodos cortos a días largos. En el mismo sentido extender el muestreo de progesterona para evaluar dicho comportamiento en razón al fotoperiodo.

VII. LITERATURA CITADA

- Agabriel J, Blanc F, Egal D, Dhour P. 2004: Influences combine´es de la saison de mise bas et de l'exposition au taureau sur la venue en cyclicité de vaches Charolaises. *Rencontres Recherches Ruminants Paris* 8-9 de´c 11, 398.
- Algire JE, Srikandakumar A, Guilbault LA, Downey BR. 1992. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. *Can J Vet Res* 56: 67–69.
- Álvarez JA.1996. Efecto de la alimentacion suplementaria antes y despues del parto sobre la actividad ovarica, condicion corporal y metabolitos sanguineos de ovejas tabasco y sobre el comportamiento productivo de sus crias en el tropico de Mexico (Tesis de maestria). Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996
- Anderson GM, Connors JM, Hardy SL, Valent M, Goodman RL, 2001. Oestradiol microimplants in the ventromedial preoptic area inhibit secretion of luteinizing hormone via dopamine neurones in anoestrous ewes. *J Neuroendocrinol* 13:1051–1058.
- ANNRC. 2001. Vitamins. In: Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council (ed.), *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7 Revised Edition, 2001. Washington, D.C.: National Academies Press;pp. 162–177.
- Arechiga CF., Staples CR, McDowell LR, PJ Hansen. 1998. Effects of timed insemination and supplemental b-Carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *JDairy Sci* 81: No. 2
- Arechiga CF, Vazquez-Flores S, Ortiz O, Hernandez-Ceron J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ. 1998. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50: 65–76.
- Arroyo LJ, Gallegos-Sanchez J, Villa-Godoy A, Berruecos JM, Perera G, Valencia J, 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19_ north latitude. *Anim Reprod Sci* 102, 24–30.
- Azais-Braesco V, Pascal G. 2000. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr* 71:1325S–1333S.
- Balmer JE, Blomhoff R. 2005. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:347–354.
- Barua AB, Olson JA. 1986. Retinoyl beta-glucuronide: an endogenous compound of human blood. *Am J Clin Nutr* 43:481–485.
- Barua AB, Sidell N. 2004. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active interesting retinoid. *J Nutr* 134:286S– 289S. Bastien J, Adam

- Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguie C, Karsch FJ, 2000: Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biol Reprod* 63, 769–774.
- Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F, 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 47:13–22.
- Billings HJ, Viguie C, Karsch FJ, Goodman RL, Connors JM, Anderson GM, 2002: Temporal requirements of thyroid hormones for seasonal changes in LH secretion. *Endocrinology* 143, 2618–2625.
- Bilska, A.T.G., Reynolds, L.P., Kirsch, J.D., Redmer, D.A., 1996. Gap junctional intercellular communication of bovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of cyclic adenosine 3,5-monophosphate. *Biol. Reprod.* 54:538–545.
- Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. 1990. Transport and storage of vitamin A. *Science* 250:399–404.
- Blomhoff R, Helgerud P, Rasmussen M, Berg T, Norum KR. 1982. In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7326–7330.
- Blomhoff R, Holte K, Naess L, Berg T. 1984. Newly administered [3H]retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp Cell Res* 150: 186–193.
- Blomhoff R, Wake K. 1991. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 5:271–277.
- Blomhoff R, y Heidi Kiil Blomhoff. 2006. Overview of Retinoid Metabolism and Function. Wiley Periodicals, Inc. (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/neu.20242
- Bourguignon J-P, Gerard A, Alvarez Gonzalez M, Purnelle G, Franchimont P. 1995. Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: Evidence from effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology*. 136:911-6.
- Bourguignon J-P, Gérard A, Alvarez-Gonzalez M-L, Fawe L, Franchimont P. 1992. Gonadal-independent developmental changes in activation of N-methyl-D-aspartate receptors involved in gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 55:634-41.
- Bowles J. and Koopman P. 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 134, 3401-3411 (2007) doi:10.1242/dev.001107
- Boylan JF, Gudas LJ. 1991. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Biol* 112:965–979.

- Boylan JF, Gudas LJ. 1992. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267:21486–21491.
- Brown JA, Eberhardt DM, Schrick FN, Roberts MP, Godkin JD. 2003. Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev* 64: 261–269.
- Bruning Jens C., Dinesh Gautam, Deborah J. Burks, Jennifer Gillette, Markus Schubert, Paul C. Orban, Rudiger Klein, Wilhelm Krone, Dirk Muller-Wieland, C. Ronald Kahn. 2000. Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. September 2000 Vol 289 Science www.sciencemag.org
- Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 207: 21–30.
- Budhu A, Gillilan R, Noy N. 2001. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* 305:939–949.
- Budhu AS, Noy N. 2002. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22:2632–2641.
- Burton, G. W., and K. U. Ingold. 1984. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:569–573.
- Calderón F., Chauveau-Duriot B., Martin B., Graulet B., Doreau M., Noziere P. 2007. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *J Dairy Sci* 90:2335–2346.
- Casanueva FF, Dieguez C. 1999. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol*. 20:317-63.
- Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F, Tena-Sempere M. 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147:4852–4862.
- Chambon P. 2004. How I became one of the fathers of a superfamily. *Nat Med* 10:1027–1031.
- Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. 2004. Glucocorticoids and their actions. *Ann N Y Acad Sci* 1024:1–8.
- Chemineau P, D Guillaume, M Migaud, JC Thie'ry, MT Pellicer-Rubio and B Malpoux . 2008. Seasonality of Reproduction in Mammals: Intimate Regulatory Mechanisms and Practical Implications. *Reprod Dom Anim* 43:(Suppl. 2) 40–47.

- Chemineau P, Daveau A, Maurice F, Delgadillo JA. 1992: Seasonality of oestrus and ovulation is not deeply modified by submitting Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin Res* 8:299–312.
- Chemineau P, Daveau A, Pelletier J, Malpaux B, Karsch FJ, Viguie C, 2003: Changes in the 5-HT_{2A} receptor system in the pre-mammillary hypothalamus of the ewe are related to regulation of LH pulsatile secretion by an endogenous circannual rhythm. *BioMed Central Neurosci* 4, 1 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/4/1>).
- Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Leboeuf B, Delgadillo JA, Deletang F, Pobel T, Brice G, 1996: Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *Prod Anim* 9:45–60.
- Cifelli CJ, Green JB, Green MH. 2005. Dietary retinoic acid alters vitamin A kinetics in both the whole body and in specific organs of rats with low vitamin A status. *J Nutr* 135:746–752.
- Crow JA, Ong DE. 1985. Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4707–4711.
- De Silva M, Reeves JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil* 1985; 75: 547– 549.
- Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P, 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by short photoperiodic cycles in he-goats. *Small Ruminant Res* 9:47–59.
- Delgadillo JA, Fitz-Rodriguez G, Duarte G, Veliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernandez H, Malpaux B, 2004: Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod Fertil Dev* 16, 471– 478.
- Denisenko-Nehrbass NI, Mello CV. 2001. Molecular targets of disulfiram action on song maturation in zebra finches. *Brain Res Mol Brain Res* 87:246–250.
- Deveson I. A. Forsyth J. Arendt. 1992. Retardation of pubertal development by prenatal long days in goat kids born in autumn. *J. Repr. Fertil. Ltd* 95, 629-637.
- Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. 2008. Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:242–246.
- Donoso AO, López FJ, Negro-Vilar A. 1990. Glutamate receptors of the non-N-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone releasing hormone release by excitatory amino acid in vitro. *Endocrinology*. 126:414-20.
- Duester G, Mic FA, Molotkov A. 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143:201– 210.

- Dupe V, Matt N, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14036–14041.
- Duque P, Díez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidalgo CO, Facal N, Gómez E. 2002. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. *Hum Reprod* 17:2706-2714.
- E X, Zhang L, Lu J, Tso P, Blaner WS, Levin MS, Li E. 2002. Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J Biol Chem* 277:36617– 36623.
- Ellison PT. 2001. *On fertile ground*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Escobar Medina FJ. 2004. Estacionalidad reproductiva de la cabra. Unidad Academica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autonoma de Zacatecas. Resumen de investigación. Zacatecas, México 2004.
- Evans R. 2004. A transcriptional basis for physiology 1. *Nat Med* 10:1022–1026.
- Everts HB, Sundberg JP, Ong DE. 2005. Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat. *Exp Cell Res* 308:309–319.
- Eyigor O, Jennes L. 1997. Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology*. 1997;66:122-9.
- Fasanya, O. O. A. Molokwu, E. C. I. Eduvie, L. O. Dim, N. I., 1992: *Anim. Re. Sci.* 29, 157.
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocr* 127–132:254–255.
- Francis J P Ebling. 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* (2005) 129 675–683. © Society for Reproduction and Fertility DOI: 10.1530/rep.1.00367 ISSN 1470–1626 1741–7899 Online version via www.reproduction-online.org
- Fraser PD, Bramley PM. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43:228–265.
- Frolik C. 1984. Metabolism of retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. *The Retinoids*. New York: Academic Press, p 177–208.
- Gallegos-Sanchez J, Delaleu B, Caraty A, Malpoux B, Thie'ry JC, 1997: Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus. *Biol Reprod* 56, 1544–1549.
- Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624–629.

- Glass JD, Ferrera S, Deaver DR, 1988: Photoperiodic adjustment in hypothalamic amines gonadotrophin-releasing hormone and b-endorphin in white-footed mouse. *Endocrinology* 123, 1119–1127.
- Glover J, Redfearn ER. 1954. The mechanism of the transformation of beta-carotene into vitamin A in vivo. *Process Biochem* 58:xv–xvi.
- Gluckman PD, Hanson MA. 2006. Evolution, development and timing of puberty. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17:7–12.
- Gómez E, Royo LJ, Duque P, Carneiro G, Hidalgo C, Goyache F, Lorenzo PL, Alvarez I, Facal N, 2003. Diez C: 9-cis retinoic acid during in vitro maturation improves development of the bovine oocyte and increases midkine but not IGF-I expression in cumulus-granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 2003, 66:247–255.
- Goodman DS, Huang HS. 1965. Biosynthesis of Vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science* 149:879–880.
- Goodwin T. W. Gregory B. A. 1948. Studies in vitamin A. VII Carotene metabolism in herbivores. *Biochem Journal*. 43: 505, 512. 1948
- Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL. 1996. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci*. 16:5281–9.
- Gracia Lopez C, Lucrecia Moreno, Susana Masia, Paloma Perez y Domingo Barettino. 2002. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *The journal of biological chemistry* Vol. 277, No. 28, Issue of July 12, pp. 25297–25304, © 2002 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.jbc.org>
- Grasselli F, Ponderato N, Basini G, Tamanini C. 2001. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/ cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*; 20: 241–252.
- Grumbach MM. 2005. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res*;57:2–14.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2):175–189.
- Gundersen TE, Blomhoff R. 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A* 935:13–43.
- 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. *Reprod Domest Anim* 37: 96–99.

- Harney, JP, Mirando, MA, Smith, LC, Bazer, FW, 1990. Retinol-binding protein: a major secretory product of the pig conceptus. *Biol. Reprod.* 42, 523–532.
- Harrison EH. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25:87–103.
- Hartmann S, Brors O, Bock J, Blomhoff R, Bausch J, Wiegand UW, Hartmann D, *et al.*, 2005. Exposure to retinyl esters, retinol, and retinoic acids in non-pregnant women following increasing single and repeated oral doses of vitamin A. *Ann Nutr Metab* 49:155–164.
- Haselbeck RJ, Hoffmann I, Duester G. 1999. Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev Genet* 25:353–364.
- Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. 2000. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*; 56: 520–526.
- Hathcock JN, Hattan DG, Jenkins MY, McDonald JT, Sundaresan PR, Wilkening VL. 1990. Evaluation of vitamin A toxicity. *Am J Clin Nutr* 52:183–202.
- Hattori MA, Kato Y, Fujihara N. 2002. Retinoic acid suppression of endothelial nitric oxide synthase in porcine oocyte. *Can J Physiol Pharmacol*; 80: 777– 782.
- Hattori MA, Takesue K, Kato Y, Fujihara N. 2001. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function. *Mol Cell Biochem* 2001; 219: 121–126.
- Hebuterne X, Wang XD, Smith DE, Tang G, Russell RM. 1996. In vivo biosynthesis of retinoic acid from beta-carotene involves an excentric cleavage pathway in ferret intestine. *J Lipid Res* 37:482–492.
- Herr FM, Ong DE. 1992. Differential interaction of lecithin- retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry* 31:6748–6755.
- Hidalgo CO, Diez C, Duque P, Facal N, Gomez E. 2003. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. *Reproduction*; 125: 409– 416.
- Hileman SM, Schillo KK, Boling JA., Estienne MJ. 1990. Effects of age of fasting-induced changes in insulin, glucose, urea nitrogen, and free fatty acids in sera of sheep. *Proc Soc Exp Biol Med* 194:21-25
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. 2008. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E827–E832.
- Hillier SG. 2001. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*; 179: 39–46.

- Hindmarsh P., Di Silvio L, Pringle PJ, Kurtz AB, Brook CG. 1988. Changes in serum insulin concentration during puberty and their relationship to growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 28:381-388.
- Hsueh AJ, Bicsak TA, Jia XC, Dahl KD, Fauser BC, Galway AB, Czekala N, Pavlou SN, Papkoff H, Keene J, Boime I. 1989. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active folliclestimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 45:209–277.
- Ikeda S, Imai H, Yamada M. 2003. Apóptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulusenclosed oocytes. *Reproduction* 2003; 125: 369–376. 89.
- Ikeda S, Kitagawa M, Imai H and Yamada M. 2005. The Roles of Vitamin A for Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 51, No. 1
- Ingrand S, Cournut S, Dedieu B, Antheaume F, 2003: La conduite de la reproduction du troupeau de vaches allaitantes: mode'lisisation des prises de de'cision. *Prod Anim* 16, 263–270.
- International Union of Pure and Applied Chemistry—International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB). 1982. Nomenclature of retinoids. Recommendations 1981. *Eur J Biochem* 129:1–5.
- Jasienska G, Jasienski M. 2008. Interpopulation, interindividual, intercycle, and intracycle natural variation in progesterone levels: a quantitative assessment and implications for population studies. *Am J Hum Biol* 20:35–42.
- Jeans AL, Gudas LJ., 1995. The role of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem* 64:201–233.
- Jiménez-Lara AM, Clarke N, Altucci L, Gronemeyer H. 2004. Retinoic-acid-induced apóptosis in leukemia cells. *Trends MolMed* 10:508–515.
- Joubert, D. M., 1963. Puberty in female farm animals. *Anim. Breed. Abstr.* 31, 295.
- Kanai M, Raz A, Goodman DS. 1968. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J ClinInvest* 47:2025–2044.
- Karrer P, Helfenstein A, Wehrli H, Wettstein A. 1930. Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv Chim Acta* 13. Kastner P, Mark
- Kawashima, C. K. Kida a, F.J. Schweigert C. A. Miyamoto. 2008. Relationship between plasma beta carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows, *Anim. Reprod. Sci.*, doi:10.1016/j.anireprosci.
- Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, von Lintig J. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276:14110–14116.
- Kim KS, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1997. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competency of bovine oocytes in vitro. *Reprod Fertil Dev*; 9: 763–766.

- Klosterman E. W., Bolin D.W. and Light B.R. 1949. Carotene and vitamin A studies in sheep. *J. Anim. Sci.*, 8:624
- Kuzawa CW. 2007. Developmental origins of life history: growth, productivity, and reproduction. *Am J Hum Biol* 19:654–661.
- Lampen A, Meyer S, Nau H. 2001. Effects of receptor–selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all-trans-retinoic acid in intestinal cells 1. *Drug Metab Dispos* 29:742–747.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL, Viguie C, Billings HJ, Karsch FJ, 2002: Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reproduction Suppl* 59, 149–165.
- Li E, Tso P. 2003. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol* 14:241–247.
- Lim JM, Hansel W. 1998. Improved development of in vitro-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 45–53.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. 2003. Mouse retinal dehydrogenase 4. molecular cloning, cellular expression and activity in 9-cis retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278:9856–9861.
- Liu J, Carriere PD, Dore M, Sirois J. 1997. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 57:1524–1531.
- Lonergan P, Gutiérrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, Fuente J, Boland M. 2003. Relative messenger mRNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulator luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 2003, 66:297-305.
- Madani, M.O.K. Rahal, M.S. 1988. Puberty in Libyan male goats. *Anim. Repr. Sci.* 17, 207-216.
- Maden M, Hind M. 2003. Retinoic acid, a regeneration inducing molecule. *Dev Dyn* 226:237–244.
- Malau-Aduli B. S., L. O. Eduvie, C. A. M. Lakpini and A. E. O. Malau-Aduli. 2005. Influence of crop residue ration supplementation on the attainment of puberty and postpartum reproductive activities of Red Sokoto goats. *J Animal Physiology and Animal Nutr* 89 11–19 ^a 2005 Blackwell Publishing Ltd ISSN 0931-2439
- Malpaux B, 2006: Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Neill JD (ed.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 2231– 2281.
- Mancio, AB.; Viana, JAC, Azavedo, N. A.; Rehfeld, O. A. M.; Ruas, J. R. M.; Amaral, R., 1982: *Arq. Escol. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais* 34, 573.
- McDonald, LE., 1980. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, 560 pp.

- Meza-Herrera, C.A., A. Gonzalez-Bulnes, R. Kridli, M. Mellado, C.F. Arechiga-Flores, H. Salinas, and J.M. Luginbuhl. 2010a. Neuroendocrine, metabolic and genomic cues signaling the onset of puberty in females. *Reprod. Domest. Anim.* In press. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01355.x
- Meza-Herrera, CA, FG Veliz-Deras, M Wurzinger, B Lopez-Ariza, G Arellano-Rodriguez, R Rodriguez-Martinez. 2010b. The kiss-1, kisspeptin, gpr-54 complex: A critical modulator of GnRH neurons during pubertal activation. *J. Appl. Biomed.* 8:1-9.
- Minegishi T, Karino S, Tano M, Ibuki Y, Miyamoto K. 1996. Regulation of midkine messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:799–805.
- Mircea CN, Lujan M, Pierson R. 2007. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstetrics Gynaecol Canada (JOGC)* 29: 887–902.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109–142.
- Moore T. 1929. The relation of carotenoid to vitamin A. *Lancet*, 2: 380-381.1929.
- Mungrue IN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. 2003. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 179: 123–135.
- Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 134:237S–240S
- Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N, Norum KR, Blomhoff R. 1997. Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res* 38:645– 658.
- Napoli JL, Race KR. 1988. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J Biol Chem* 263:17372– 17377.
- Nathan C.1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051–3064.
- Neill JD. 2006. Citado por Ojeda SR, Skinner MK. Puberty in the rat. 2006. *The Physiology of Reproduction* (3rd Edition). Academic Press/Elsevier, San Diego.. 2061-126.
- Newcomer ME, Ong DE. 2000. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 1482:57–64.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dolle P. 2003. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 110:165–171.
- Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dolle P. 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62:67–78.

- Niles RM. 2004. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* 555:81– 96.
- Noy N. 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000; 348 (3): 481–495.
- Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Mialot JP, Mermillod P, Charpigny G. 2002. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol Reprod Dev*; 61: 93–101.
- NRC. 1998. Nutrient requeriments of goats: Angora, dairy and meat goats in temperature and tropical coutries. 1ra Edición. National academy Press. Washington.
- Ohyama Y, Miyamoto K, Minamino N, Matsuo H. 1994. Isolation and identification of midkine and pleiotrophin in bovine follicular fluid. *Mol Cell Endocrinol* 105:203–208.
- Ojeda SR. 2006. La regulacion neuroendocrina de la pubertad normal y precoz: nuevos genes y nuevos conceptos. *An Pediatr* 64 (Supl 2):8-14
- Ojeda SR, Ma YJ, Lee BJ, Prevot V. 2000. Glial-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res.* 55:197-223.
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A. 2003. Glia-to neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med.* 35:244-55.
- Ojeda SR, Terasawa E. 2002. Neuroendocrine regulation of puberty. *Hormones, Brain and Behavior* (Vol 4). Elsevier, New Yorkpp. 589-659.
- Ojeda SR, Urbanski HF. 2005. Puberty in the rat. En: Neill JD, editor. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; p. 2061-126.
- Olson BR, Scott DC, Wetsel WC, Elliot SJ, Tomic M, Stojilkovic S, Nieman LK., Wray S. 1995. Effects of Insulin-Like Growth Factors I and II and Insulin on the Immortalized Hypothalamic GTI-7 Cell Line. *Neuroendocrinology* 62, 155.
- Olson JA, Hayaishi O. 1965. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:1364– 1370.
- Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A. 2003. Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF:relationship to outcome. *Hum Reprod*; 18:2270– 2274.
- Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L,. 2004. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr* 134:276S–280S.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. 2003. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev.* 2003;24:668-93.
- Parker RS. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J* 10:542–551.

- Paul MJ, Zucker I, Schwartz WJ, 2008: Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 341–361.
- Pelletier J, Ortavant R, 1975: Photoperiodic control of LH release in the ram. II. Light-androgens interaction. *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 78, 442–450.
- Perissi V, Rosenfeld MG. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat RevMol Cell Biol* 6:542–554.
- Peterson PA. 1971. Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A. *J Biol Chem* 246:44–49.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444–450.
- Petkovich M. 1992. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 12:443–471.
- Pierre Germain, Pierre chambon, Gregor Eichele, Ronald M. Evans, Mitchell A. Lazar, Mark Leid, Angel R. de Lera, Reuben Lotan, David J. Mangelsdorf, and Hinrich Gronemeyer. 2006. Retinoid X Receptors. *Pharmacol Rev* 58:760–772, 2006. ©The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 50425/3157476.
- Poppe K, Velkeniers B, Glinooer D. 2008. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. Published on line May 27, 2008.
- Poretsky L, Kalin M. 1987. The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Rev* 8:132–141.
- Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, *et al.*, 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinolbinding protein. *EMBO J* 18:4633–4644.
- Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman ME, Blaner WS. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med* 24:421–430.
- Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M. 2005. The control of morphogen signalling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol*.
- Reijntjes S, Gale E, Maden M. 2004. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* 230:509–517.
- Richards JS.1997. Sounding the alarm—does induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 control the mammalian ovulatory clock? *Endocrinology* 138:4047–4048.
- Richter TA, Terasawa E. 2001. Neural Mecanisms underlying the puberal increase in LHRH release in the Rhesus Monkey. *Trends Endocrinol Metab.*; 12: 353-9.

- Rigas JR, Dragnev KH. 2005. Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist* 10:22–33.
- Rodríguez Amaya DB., 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch Latinoam Nutr* 49:38S–47S
- Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S, Milunsky A. 1995. Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333:1369–1373
- Sales J.N.S., L.M.K. Dias, A.T.M. Viveiros, M.N. Pereira, J.C. Souza. 2008. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with betacarotene and tocopherol. *Anim Repr Sci* 106 (2008) 77–89 doi:10.1016 / j.anireprosci.2007.04.001
- Sakurai K., Ohkura S., Matsuyama Sh, Katoh K., Obara Y y Okamura H. 2004. Body growth and plasma concentrations of metabolites and metabolic hormones during the pubertal period on female shiba goats. *J. Reprod. Dev.* 50: 197-205,2005.
- Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP. 2006. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 147:816–826.
- Schneider JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81:289–317.
- Schubert M, Holland ND, Escriva H, Holland LZ, and Vincent Laudet. 2004. Retinoic acid influences anteroposterior positioning of epidermal sensory neurons and their gene expression in a developing chordate (amphioxus). *PNAS* 10320–10325, vol. 101; No. 28 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403216101
- Schweigert FJ, Wierich M, Rambeck WA, Zucker H. 1988. Carotene cleavage activity in bovine ovarian follicles. *Theriogenology*; 30: 923–930.
- Schweigert FJ, Zucker H. 1998. Concentrations of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J Reprod Fertil*; 82: 575–579.
- Senoo H. 2004. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 37:3–15.
- Shimshek DR, Bus T, Grinevich V, Single FN, Mack V, Sprengel R, Spergel DJ, Seeburg PH. 2006. Impaired reproductive behavior by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Mol Endocrinol.* 2006;20:219-31.
- Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1315S–1321S.
- Sirsjo A, Gidlof AC, Olsson A, Torma H, Ares M, Kleinert H, Forstermann U, Hansson GK. 2000. Retinoic acid inhibits nitric oxide synthase-2 expression through the retinoic acid receptor- α . *Biochem Biophys Res Commun* 270: 846–851.

- Smith JT. 2008. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev* 57:288–298.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. 1976. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 35:1332–1338.
- Sporn MB, Roberts AB. 1985. What is a retinoid? *Ciba Found Symp* 113:1–5.
- Stahl, W., Nicolai, S., Briviba, K., Hanusch, M., Broszeit, G., Peters, M., Martin, H.D., Sies, H., 1997. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 18, 89–92.
- Stallcup O.T. and H.A. Herman. 1950. In vitro studies on the conversion of carotene to vitamin A in dairy calves. *Journal Series 1139* department of Dairy Husbandry, missouru Agricultural experiment Station. January 7, 1950
- Steiner RA. 1987. Nutritional and metabolic factor in the regulation of reproductive hormone secretion in the primate. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:159-175.
- Studer VA, Grummer RR, Bertics SJ, Reynolds CK. 1993. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J Dairy Science* 1993; 76: 2931-2939
- Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. 2002. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300- dependent and - independent mechanisms. *Cancer Res* 62: 2522–2530.
- Swick R. W., Grummer R.H., and Baumann C.A. 1949. The effect of Iodinated casein and thiouracil on the carotenoid metabolism of the pig. *Journal of animal science*, 8:645. 1949
- Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G. 1999. Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol* 216:282–296.
- Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, *et al.*, 2004. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9- cis and all-trans isomers of retinoic acid 1. *J Biol Chem* 279:77–85.
- Tarek HE, Metwally, Parvis M Pour. 2007. The Retinoid induced pancreatic cancer redifferentiation-apoptosis sequence and the mitochondria: A suggested obligatory sequence of events. *Journal of the Pancreas* Vol. 8, No. 3 May 2007. <http://www.joplink.net> [ISSN 1590-8577]
- Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. 2003. Gonadotropins and gonadotropin receptors. En: Fauser BCJM, editor. *Reproductive Medicine - Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. New York: Parthenon Publishing. p. 225-44.

- Tena-Sempere. M. 2007. Conferencias: Kisspeptinas y pubertad. *An Pediatr (Barc)* 2007;66(Supl 1):31-7
- Terasawa E, Fernandez DL. 2001. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 2001;22:111-51.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 1987; 27: 865– 896.
- Thiery JC, Gayrard V, Le Corre S, Viguie C, Martin GB, Chemineau P, Malpoux B, 1995: Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 285–296.
- Thiery JC, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Ravault JP, 1989: Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 49, 80–87.
- Toufexis DJ, Yorozu S, Woodside B. 2002. Y1 receptor activation is involved in the effect of exogenous neuropeptide Y on pup growth and the early termination of lactational diestrus in the postpartum rat. *J Neuroendocrinol* 14:354–60.
- Tracy L., Dawn E., J Lannett E. and James Godkin. 2004. Retinol improves bovine embryonic development in vitro *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004, 2:83 doi:10.1186/1477-7827-2-83
- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101:294–301.
- Upadhyaya K. R., Radha K. S. and Madhyastha H. K.. 2007. Cell Cycle Regulation and Induction of Apóptosis by β -carotene in U937 and HL-60 Leukemia Cells. *JBioch Molec Biol.* 40, 1009-1015
- Urbanski HF, Ojeda SR.1990. A role for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology.* 1990;126:1774-6.
- Valeggia C, Ellison PT. 2004. Lactational amenorrhea in well nourished Toba women of Formosa, Argentina. *J Biosoc Sci* 36:573–595.
- Vergara MN, Arsenijevic Y, Rio-Tsonis K. 2005. CNS regeneration: A morphogen's tale. *J Neurobiol* 64:491–507.
- Vitzthum VJ. 2001. Why not so great is still good enough: Flexible responsiveness in human reproductive functioning. In: Ellison PT, editor. *Reproductive ecology and human evolution*. New York: Aldine de Gruyter. p 179–202.
- von Lintig J, Vogt K. 2000. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 275:11915–11920.

- Wald G. 1968. Molecular basis of visual excitation. *Science* 162:230–239.
- Wang XD, Russell RM, Liu C, Stickel F, Smith DE, Krinsky NI. 1996. Beta-oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoic acids. *J Biol Chem* 271:26490–26498
- Weiss WP. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2493–2501.
- Weng, B.C., Chew, B.P., Wong, T.S., Park, J.S., Kim, H.W., Lepine, A.J., 2000. Beta-Carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *J Anim Sci* 78:1284–1290.
- White JA, Beckett-Jones B, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G, Petkovich M. 1997. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272:18538–18541.
- White JA, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S. 2000. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6403–6408.
- Wolbach S, Howe P. 1925. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J Exp Med* 42:753–777.
- Woodside B, Beaule C, Lauay C. 2002. Chronic neuropeptide Y infusion during lactation suppresses pup growth and reduces the length of lactational infertility in rats. *Horm Behav* 41:59–69.
- World Health Organization. 1995. Global prevalence of vitamin A deficiency. Geneva.
- Wyss A, Wirtz G, Woggon W, Brugger R, Wyss M, Friedlein A, Bachmann H. 2000. Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 271:334–336.
- Xing W, Sairam MR. 2002. Retinoic acid mediates transcriptional repression of ovine folliclestimulating hormone receptor gene via a pleiotropic nuclear receptor response element. *Biol Reprod*;67: 204–211.
- Yamagata Y, Nakamura Y, Sugino N, Harada A, Takayama H, Kashida S, Kato H. 2002. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. *Endocr J*; 49: 219–226.
- Yang WL, Frucht H. 2001. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*; 22: 1379–1383.
- Zanotti G, Berni R. 2004. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 69:271–295.