

Tasa de ovulación, prolificidad y tasa de gestación en cabras tratadas con glicerol por vía oral

Ubaldo Aguilar¹
Joel Hernández Cerón^{1*}
0000-0002-3892-9427
Yesmín Domínguez²
0000-0002-1944-7772
Carlos G. Gutiérrez¹
0000-0002-6098-3913

¹ Departamento de Reproducción

² Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en el Altiplano

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Ciudad de México
04510, México

***Autor para correspondencia:**
Tel: +52 5 5622-5860
Correo electrónico:
jhc@unam.mx

Resumen

Se probó si la administración oral de glicerol, al momento de retirar el progestágeno y durante los primeros seis días del ciclo estral, incrementaba la tasa de ovulación, la prolificidad y la tasa de gestación en cabras. Se insertaron esponjas intravaginales con acetato de fluorogestona a 129 cabras por 12 días; al retirar la esponja se asignaron al azar a uno de dos tratamientos: glicerol (n = 65) recibió 100 mL de glicerol por vía oral, mismo tratamiento que se repitió los días 0, 2, 4 y 6 (estro = día 0), y testigo (n = 64), el cual no recibió glicerol. Las cabras en estro recibieron monta. Entre los días 8 y 12 del ciclo estral, se determinó la tasa de ovulación mediante ecografía. El diagnóstico de gestación se realizó mediante una ecografía el día 40 y la prolificidad se determinó al parto. En seis cabras tratadas con glicerol y cinco testigos, se determinaron las concentraciones de insulina mediante radioinmunoensayo a las 0, 2, 4, 8 y 12 h después de la ingestión de glicerol. La proporción de cabras con ovulación múltiple (glicerol = 71 vs testigo = 64) y la proporción de cabras con parto múltiple (glicerol = 52 vs testigo = 56) fueron similares ($P > 0.05$) entre los tratamientos. De manera similar, la tasa de gestación fue igual ($P > 0.05$) entre los tratamientos (glicerol = 88 vs testigo = 85%). Las concentraciones de insulina tendieron a ser mayores en las cabras tratadas con glicerol ($P = 0.08$). Se concluye que la administración oral de 100 mL de glicerol al momento de retirar el progestágeno y durante los primeros seis días del ciclo estral, no incrementó la tasa de ovulación, la prolificidad, ni la tasa de gestación en cabras.

Palabras clave: Tasa de ovulación; Prolificidad; Glicerol; Insulina; Cabras.

Introducción

El aumento de la tasa de ovulación y la prolificidad en pequeños rumiantes se ha logrado de manera práctica mediante tratamientos hormonales y por medio del incremento del aporte energético en la dieta (*flushing*). Aunque aún no se comprende completamente el mecanismo de acción del *flushing*, las evidencias indican que sus efectos se producen a nivel ovárico, son independientes de las concentraciones de gonadotropinas y se relacionan con un incremento en los ni-

Recibido: 2015-10-12
Aceptado: 2016-03-16
Publicado: 2016-03-28

Información y declaraciones adicionales
en la página 8

© Derechos de autor:
Ubaldo Aguilar et al. 2016

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

veles sanguíneos de glucosa e insulina (Downing *et al.*, 1995; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004) Dupont *et al.*, 2014).

En la oveja, la suplementación durante un periodo corto con grano lupino — una leguminosa con alto contenido de proteína y energía metabolizable— puede incrementar la tasa de ovulación. La suplementación con grano lupino estimula la folículo-genesis e incrementa la tasa de ovulación, sin inducir cambios en el peso o en la condición corporal (Scaramuzzi *et al.*, 2006). La glucosa y la insulina pueden influir en el aumento de la tasa de ovulación, ya que favorecen el desarrollo folicular y se relacionan con una mayor cantidad de folículos capaces de responder al estímulo de las gonadotropinas (Gutiérrez *et al.*, 1997; Viñoles *et al.*, 2005). Asimismo, la glucosa y la glucosamina estimulan la capacidad esteroidogénica de los folículos mediante un aumento en la actividad del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004). En estudios realizados en cabras, se observa que el aumento de insulina inducido por la dieta o por la administración de insulina incrementa la tasa de ovulación (Suguna *et al.*, 2009; Zabuli *et al.*, 2010).

El aumento de las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina puede lograrse administrando soluciones glucogénicas. En ovejas se han utilizado tratamientos cortos con glicerol y propilenglicol para aumentar la tasa de ovulación. Rodríguez-Iglesias *et al.* (1996) lograron aumentar la tasa de ovulación en ovejas anéstricas mediante la administración oral de 100 mL de una solución de glicerol y propilenglicol antes de la exposición a los machos. Gutiérrez *et al.* (2011) lograron incrementar las concentraciones séricas de glucosa, insulina y la tasa de ovulación con una sola toma de 300 mL de glicerol al momento de la inducción de la luteólisis con PGF $_{2\alpha}$ en ovejas Pelibuey. En este mismo estudio, lograron un efecto similar en la tasa de ovulación con una sola toma de 100 mL de glicerol.

Por otra parte, la insulina favorece el desarrollo embrionario temprano. En embriones bovinos producidos *in vitro*, la insulina ejerce un efecto mitogénico y antiapoptótico (Byrne *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2003), lo que resulta en un aumento en la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto. Cabe señalar, también, que altas concentraciones de insulina tienen un efecto negativo en el desarrollo embrionario en el ganado bovino (Fouladi-Nashta *et al.*, 2006) y ovino (Carrera-Chávez *et al.*, 2014). Además, se ha observado un efecto positivo de la insulina sobre la función lútea. En un estudio realizado en cabras, la administración de insulina se relacionó con concentraciones más altas de progesterona durante la gestación (Suguna *et al.*, 2009). Se conoce que niveles altos de progesterona se asocian con un desarrollo embrionario acelerado (Garret *et al.*, 1988), lo cual podría reflejarse en menos pérdidas embrionarias. En vacas lecheras, la administración de 1 L de glicerol durante los primeros seis días posteriores a la inseminación, incrementa las concentraciones sanguíneas de insulina y favorece la tasa de gestación (Ortega *et al.*, 2010). Por lo tanto, en el presente trabajo se probó si la administración oral de 100 mL de glicerol al momento de retirar el progestágeno y durante los primeros seis días del ciclo estral, incrementaba la tasa de ovulación, la prolificidad y la tasa de gestación en cabras.

Materiales y métodos

Localización

El experimento se llevó a cabo de septiembre a noviembre —periodo comprendido dentro de la época reproductiva de las cabras en México (Arvizu *et al.*, 1995)— en un centro experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, localizado en Tequisquiapan, Querétaro (latitud: 20° 31'21" N y altitud: 1881 msnm). El clima de la región es semiseco templado, con una temperatura anual promedio de 17.5°C y una precipitación pluvial media anual de 511.8 mm (García, 1981).

Animales

Se utilizaron 129 cabras (22 primíparas y 107 multíparas) de raza cruzada (Boer-Alpino Francés), ciclando y con condición corporal entre 2 y 3 (Russel *et al.*, 1969). Las cabras permanecieron en estabulación y se alimentaron con una ración basada en heno de alfalfa, ensilado de maíz y concentrado, lo cual cubría sus necesidades de acuerdo con las necesidades marcadas en los cuadros del *National Research Council* (NRC). El manejo de los animales durante el experimento fue aprobado por el Consejo Académico del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tratamientos

A todas las cabras se les insertó una esponja intravaginal impregnada con 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA; Chronogest; MSD Salud Animal, México; Intervet México, S.A. de C.V., Huixquilucan, Estado de México, México), la cual permaneció *in situ* durante 12 días. Al retirar la esponja se aplicó una dosis luteolítica de cloprostenol sódico (Celosil; MSD Salud Animal, México) y las cabras se asignaron al azar a dos tratamientos: en el grupo de glicerol ($n = 65$), los animales recibieron por vía oral 100 mL de una solución a base de glicerol y agua (90:10 v/v), la cual se repitió los días 0, 2, 4 y 6 post-estro (estro = día 0), y las cabras en el grupo testigo ($n = 64$) no recibieron glicerol. La detección de estros se realizó con machos provistos de un mandil. Las hembras detectadas en estro recibieron una monta con machos de fertilidad probada.

Entre los días 8 y 12 posmonta, se determinó la tasa de ovulación mediante ecografía transrectal contando el número cuerpos lúteos; para este propósito se utilizó un transductor lineal de 7.5 MHz (Aloka, Co., LTD, Tokyo, Japan), al cual se le adaptó un soporte rígido que permitió su manipulación. La tasa de gestación se determinó mediante el diagnóstico de gestación por ecografía el día 40 después del servicio. La determinación de la prolificidad se llevó a cabo al momento del parto (figura 1).

Muestreo sanguíneo y procesamiento de las muestras

Para determinar las concentraciones sanguíneas de progesterona e insulina, se muestreó la sangre de seis cabras tratadas con glicerol y la de cinco testigos seleccionadas al azar. Las muestras para cuantificar las concentraciones sanguíneas de progesterona se tomaron diariamente entre los días 1 y 17 del ciclo estral. Los ciclos de dos cabras del grupo testigo fueron cortos (regresión prematura del

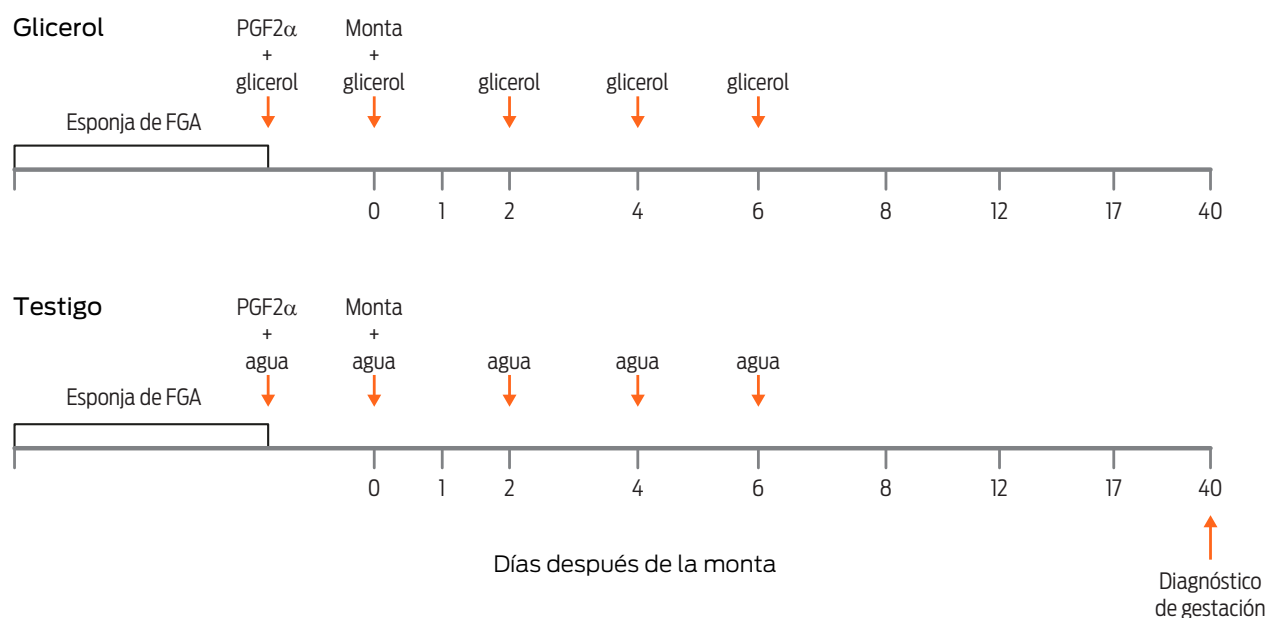


Figura 1. Esquema de los tratamientos.

cuerpo lúteo), por lo que estas cabras no se incluyeron en el análisis estadístico de progesterona. Se realizó un muestreo el día 4 del ciclo estral para determinar las concentraciones sanguíneas de insulina inducidas por la administración oral de glicerol. La primera muestra se tomó antes del tratamiento (0 h) y las siguientes a las 2, 4, 8 y 12 h después de la ingesta del glicerol.

Las muestras de sangre (10 mL) se obtuvieron por punción de la vena yugular, en tubos Vacutainer[®] adicionados con 100 μ L de citrato de sodio. Las muestras se centrifugaron a 1500 xg durante 10 minutos para separar el plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis. Las concentraciones de progesterona e insulina se determinaron mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count[®], RIA kit, DPC; USA). En el caso de progesterona, la sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/mL, con un coeficiente de variación intraensayo de 4.2%, mientras que para insulina la sensibilidad fue 0.052 ng/mL, con un coeficiente de variación intraensayo de 3.3%.

Análisis estadístico

Se utilizó un modelo de regresión logística para determinar el efecto del tratamiento con glicerol en la proporción de cabras con ovulación y partos múltiples. Asimismo, mediante regresión logística, se analizó el efecto del número de partos (primíparas y multíparas) y su interacción con el tratamiento [SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC)]. La tasa de ovulación y la prolificidad se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney, en la cual se consideró el efecto del tratamiento y su interacción con el número de partos. Las concentraciones de progesterona e insulina se compararon por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas; el modelo incluyó el tratamiento, el tiempo y su interacción. En todos los casos se consideró como diferencia estadística con un valor de $P < 0.05$ y una tendencia con valor de $P \leq 0.10$.

Resultados y discusión

La administración oral de 100 mL de glicerol al momento de retirar el progestágeno no incrementó la tasa de ovulación; la proporción de cabras con ovulación múltiple y partos múltiples fue similar entre los tratamientos (**cuadros 1 y 2**). La tasa de ovulación [glicerol = 1.84 ± 0.64 vs testigo = 1.80 ± 0.72 (media $\pm$ desviación estándar)] y la prolificidad [glicerol = 1.58 ± 0.61 vs testigo = 1.60 ± 0.64 (media $\pm$ desviación estándar)] fueron similares entre los tratamientos. Estos resultados son diferentes a los encontrados en ovejas por [Rodríguez Iglesias et al. \(1996\)](#) y [Gutiérrez et al. \(2011\)](#). La causa por la cual el tratamiento no tuvo un efecto favorable en la tasa de ovulación puede estar relacionada con la respuesta metabólica a la dosis de glicerol administrada. La dosis de 100 mL de glicerol se determinó con base en los resultados obtenidos en la oveja ([Gutiérrez et al. 2011](#)); en dicho estudio, la administración de 100 mL de glicerol provocó un incremento de la tasa de ovulación similar al obtenido con 300 mL, por lo cual se decidió administrar 100 mL.

En esta investigación, las concentraciones séricas de insulina no se vieron afectadas por el tratamiento ($P = 0.11$), pero sí hubo una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P = 0.08$). Así, las concentraciones de insulina tendieron a ser mayores en las siguientes 2 y 4 horas postratamiento (**figura 2**). Posiblemente este aumento discreto de las concentraciones de insulina no fue suficiente para favorecer la tasa de ovulación.

La causa de la variación en la respuesta a la misma dosis de glicerol observada entre la oveja y la cabra se desconoce. Se han evaluado soluciones glucogénicas en ovejas y vacas, pero no en cabras ([Rodríguez-Iglesias et al. 1996](#); [Ortega et al., 2010](#); [Gutiérrez et al. 2011](#)); aunque estas tres especies son rumiantes, tienen diferencias en su función digestiva y en el aprovechamiento de los forrajes. Las cabras poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten aprovechar de manera más eficiente los alimentos con alto contenido de fibra ([Silanikove, 2000](#)), por lo cual pueden ser menos sensibles a los cambios en la calidad y cantidad del alimento ofrecido. El glicerol por vía oral se utiliza como un sustrato en la fermentación ruminal, a partir del cual se puede obtener propionato o también se puede absorber directamente como glicerol a través de la mucosa ruminal, que después se convertirá en glucosa en el hígado ([Trabue et al., 2007](#)). Aunque es la misma ruta metabólica en los rumiantes, su eficiencia para desencadenar la secreción de insulina puede ser diferente entre especies; esto explicaría, en parte, el éxito del tratamiento para aumentar la tasa de ovulación en la oveja y el fracaso del mismo tratamiento en la cabra. Los resultados del presente trabajo permiten diseñar estudios futuros para la cabra con el fin de evaluar diferentes dosis de glicerol hasta encontrar la dosis que desencadene una respuesta óptima en las concentraciones séricas de insulina.

En este análisis se propuso que la administración oral de glicerol durante los primeros días del desarrollo del embrión (días 0, 2, 4 y 6 del ciclo estral) favorecería la sobrevivencia embrionaria, lo cual incrementaría la proporción de cabras gestantes y la prolificidad. Esta hipótesis se sustentó en el efecto esperado del glicerol en las concentraciones de insulina y en los efectos que tiene la insulina en el desarrollo embrionario. En estudios realizados *in vitro* e *in vivo* se observa que la insulina mejora el desarrollo embrionario mediante un aumento de la proliferación celular y la disminución de la apoptosis ([Augustin et al., 2003](#); [Suguna et al., 2009](#)), mientras que concentraciones bajas de insulina afectan negativamente el desarrollo embrionario y su capacidad para producir interferón tau ([Thatcher et al.,](#)

Cuadro 1. Porcentaje de cabras con ovulación múltiple tratadas con 100 mL de glicerol por vía oral.

Variable	Clase	Porcentaje de ovulaciones múltiples	Razón de momios	Intervalo de confianza (95%)	Valor de P
Tratamiento	Testigo	64 (29/45)	1.00		
	Glicerol	71 (35/49)	1.73	0.66-4.49	0.260
Número de partos	Primíparas	31 (5/16)	1.00		
	Múltiparas	75 (59/78)	7.56	2.25-25.31	0.001

Cuadro 2. Porcentaje de cabras con parto múltiple tratadas con 100 mL de glicerol por vía oral.

Variable	Clase	Porcentaje de partos múltiples	Razón de momios	Intervalo de confianza (95%)	Valor de P
Tratamiento	Testigo	56 (26/46)	1.00		
	Glicerol	52 (25/48)	0.95	0.40-2.20	0.906
Número de partos	Primíparas	27 (4/15)	1.00		
	Múltiparas	59 (47/79)	4.00	1.16-13.80	0.002

1995). Además, en vacas lecheras, un incremento en las concentraciones de insulina inducido por la administración de un litro de glicerol por vía oral en los primeros seis días del desarrollo embrionario (días 0, 2, 4, y 6) incrementó la tasa de gestación (Ortega *et al.*, 2010). Sin embargo, en esta investigación, la tasa de gestación (glicerol = 88 vs testigo = 85%), la proporción de partos múltiples y la prolificidad fueron similares entre los tratamientos ($P > 0.05$; cuadro 2). La carencia de efecto en la prolificidad y en la tasa de gestación, aquí observadas, probablemente obedece al incremento marginal de las concentraciones de insulina después de la ingesta de 100 mL de glicerol. Además, la tasa de gestación obtenida en ambos grupos fue alta, lo que hace más difícil ver los efectos favorables de cualquier tratamiento dirigido a mejorar la fertilidad. El número de partos afectó la tasa de ovulación y la prolificidad, pero esta variable no interactuó con el tratamiento (cuadros 1 y 2; $P > 0.1$).

También se propuso que la administración de glicerol durante los primeros días del ciclo estral podría favorecer el desarrollo embrionario y la tasa de gestación mediante el incremento de las concentraciones séricas de progesterona. Lo anterior se fundamenta en estudios en bovinos, en los cuales la insulina incrementa las concentraciones circulantes de progesterona (Spicer *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 2012). En este estudio, sin embargo, las concentraciones de progesterona entre los días 1 y 17 después de la monta fueron similares entre los grupos y no se observó interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P > 0.05$; figura 3).

La buena condición corporal de las cabras, así como la estación del año en la cual se hizo el experimento, quizá influyeron en la ausencia de un efecto positivo del glicerol. Las cabras recibieron una dieta que cubría los requerimientos señala-

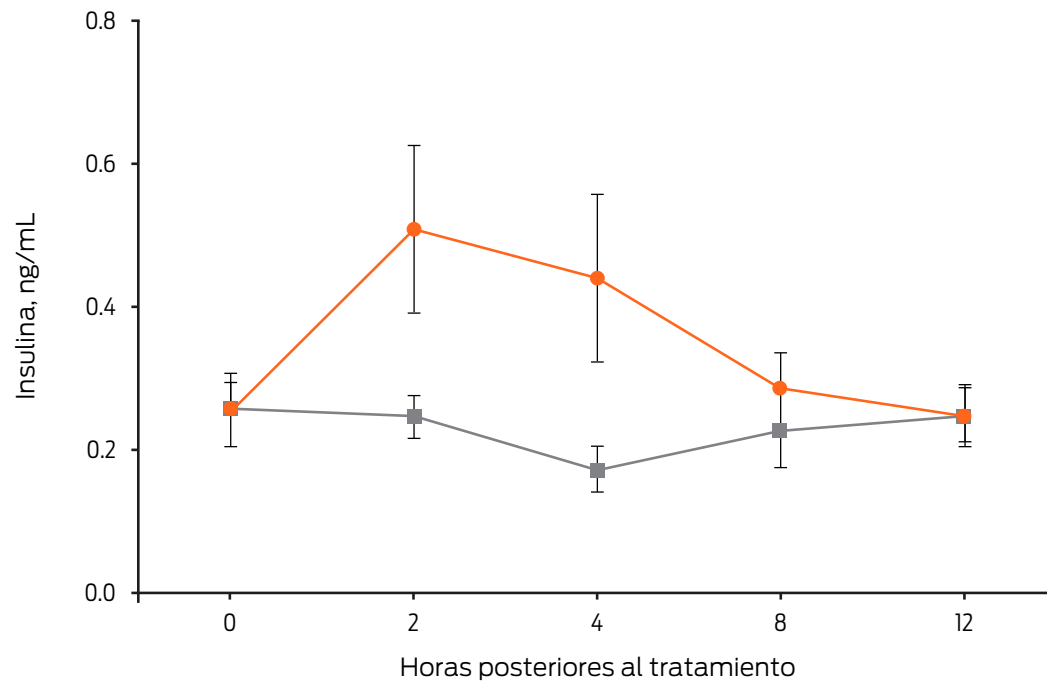


Figura 2. Concentraciones promedio de insulina ($\pm$ error estándar) en cabras tratadas con 100 mL⁻¹ de glicerol (—●—) y testigos (—■—). Interacción tratamiento por tiempo: $P = 0.08$.

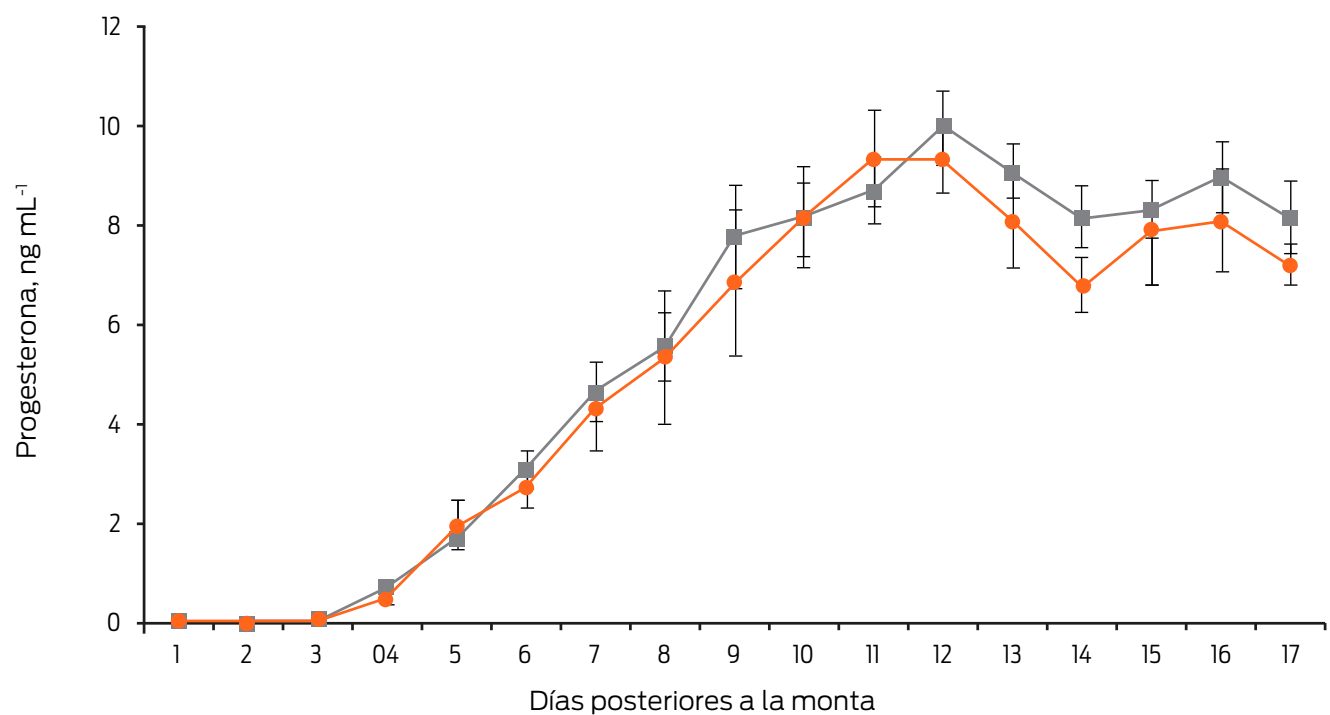


Figura 3. Concentraciones promedio de progesterona ($\pm$ error estándar) en cabras tratadas con 100 mL de glicerol (—■—) y cabras testigo (—●—) ($P > 0.05$).

dos en el NRC y su condición corporal estaba entre 2 y 3 al inicio del experimento, lo que reflejó una tasa de gestación y prolificidad altas, similares a las observadas consistentemente en el rebaño en el que se hizo el trabajo. Por otro lado, este estudio se hizo durante plena época reproductiva, factor que también contribuyó con la excelente respuesta en fertilidad. Por ello, se considera que los experimentos subsiguientes se deberán hacer en condiciones en las cuales la tasa de gestación y la prolificidad estén disminuidas, como en los programas de inducción de la ciclicidad durante la estación no reproductiva o en cabras con baja condición corporal. En estas condiciones la suplementación propuesta podría mejorar la fertilidad.

Existen tratamientos que no incrementan la tasa de gestación global, pero sí lo hacen en subgrupos de animales; en un estudio de nuestro grupo de investigación, por ejemplo, se observó que la somatotropina bovina recombinante incrementó la tasa de gestación en cabras anéstricas y la prolificidad en cabras primíparas, subgrupos de cabras que de manera natural tienden a tener una baja tasa de gestación y una baja prolificidad (Hernández y Gutiérrez, 2013).

Conclusiones

Se concluye que la administración oral de 100 mL de glicerol al momento de retirar el progestágeno y durante los primeros seis días del ciclo estral no incrementó la tasa de ovulación, la prolificidad ni la tasa de gestación en cabras.

Financiamiento

Parte de este estudio se financió con el proyecto PAPIIT IN22235 de la UNAM.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo generoso de los trabajadores y técnicos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIE-PAA), Tequisquiapan, Querétaro.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

Contribución de los autores

Ubaldo Aguilar realizó el experimento y analizó los resultados.

Yesmín Domínguez realizó el experimento.

Joel Hernández Cerón y Carlos Gutiérrez diseñaron el experimento, analizaron los resultados y escribieron el manuscrito.

Referencias

- 1) Arvizu R, Hernández Cerón J, Alberti A, Porras A, Valencia J. 1995. Inicio de la actividad ovárica posparto y características de la primera ovulación de cabras criollas paridas en dos épocas del año. *Avances en Investigación Agropecuaria* 4:9-15.
- 2) Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 126:91-99.
- 3) Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development* 62:489-495.
- 4) Carrera-Chávez JM, Hernández-Cerón J, López-Carlos MA, Lozano-Domínguez RR, Molinar F, Echavarría-Cháirez FG, Bañuelos-Valenzuela R, Aréchiga CF. 2014. Superovulatory response and embryo development in ewes treated with two doses of bovine somatotropin. *Animal Reproduction Science* 151: 105-111.
- 5) Cooke RF, Cappelozza BI, Reis MM, Bohnert DW, Vasconcelos JL. 2012. Plasma progesterone concentration in beef heifers receiving exogenous glucose, insulin, or bovine somatotropin. *Journal of Animal Science* 90:3266–3273.
- 6) Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 146:403-410.
- 7) Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. 2014. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 8:1031–1044.
- 8) Fouladi-Nashta AA, Campbell KHS. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction* 131; 449-460.
- 9) García E. 1981. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. 5ª edición. México, D. F., México: Instituto de Geografía, UNAM.
- 10) Garret JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 84:437-446.
- 11) Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. 1997. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science* 75:1876-1884.
- 12) Gutierrez CG, Ferraro S, Martinez V, Saharrea A, Cortez C, Lassala A, Basurto H, Hernandez Ceron J. 2011. Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Acta Scientiae Veterinariae* 39 (Suppl 1):305-316.
- 13) Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia* 47: 35-45. 2013.
- 14) Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction* 128:747-756.
- 15) Ortega LA, Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. 2010. La administración oral de glicerol después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein. *Técnica Pecuaria en México* 48:69-74

- 16) Rodríguez-Iglesias RM, Ciccioli NH, Irazoqui H, Giglioli C. 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Animal Reproduction Science* 44:211-221.
- 17) Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72:451-454.
- 18) Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M, Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development* 46:339-354.
- 19) Silanikove N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research* 35:181-193.
- 20) Spicer, LJ, Echternkamp SE. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 12:223-245.
- 21) Suguna K, Mehrotra S, Agarwal SK, Hoque M, Shanker U, Singh SK, Varshney VP. 2009. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function, embryo/fetal development during pregnancy in goats. *Animal Reproduction Science* 111:202-213.
- 22) Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of reproduction and Fertility* 49 (Suppl.), 15-28.
- 23) Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen MA, Reilly PJ. 2007. Ruminal Fermentation of Propylene Glycol and Glycerol *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7043-7051
- 24) Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129:299-309.
- 25) Zabuli J, Tanaka T, Lu W, Kamomae H. 2010. Intermittent nutritional stimulus by short-term treatment of high-energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cyclic goats. *Animal Reproduction Science* 122:288-293.

Ovulation rate, prolificacy and pregnancy rate in goats treated with oral glycerol

Ubaldo Aguilar¹
 Joel Hernández Cerón^{1*}
 0000-0002-3892-9427
 Yesmín Domínguez²
 0000-0002-1944-7772
 Carlos G. Gutiérrez¹
 0000-0002-6098-3913

¹ Departamento de Reproducción

² Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en el Altiplano

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. Universidad 3000, Ciudad de México
 04510, México

*Corresponding author:
 Tel: +52 5 5622-5860
 Email address:
jhc@unam.mx

Abstract

This study tested whether the oral administration of glycerol at the time of progestin removal and in the first 6 days of the estrous cycle increased the ovulation rate, prolificacy, and pregnancy rate in goats. Intravaginal sponges impregnated with fluorogestone acetate were inserted into 129 goats for 12 days; upon sponge removal, goats were randomly assigned to one of the two following treatment groups: the glycerol group (n = 65), which received an oral drench of 100 mL of glycerol upon sponge removal and was repeated on days 0, 2, 4, and 6 following estrus (estrus = day 0), and the control group (n = 64), which did not receive glycerol. The goats in estrus were mated, and their ovulation rate was determined by ultrasonography between days 8 and 12 of the estrous cycle. Pregnancy was diagnosed by ultrasonography on day 40, and the prolificacy was determined at birth. In 6 goats treated with glycerol and 5 controls, their insulin concentrations at 0, 2, 4, 8, and 12 h after the glycerol drench were determined by radioimmunoassay. The proportion of goats with multiple ovulations (glycerol = 71 vs control = 64) and the proportion of goats with multiple births (glycerol = 52 vs control = 56) were similar ($P > 0.05$) between treatments. Likewise, the pregnancy rate was similar ($P > 0.05$) between treatments (glycerol = 88 vs control = 85%). The insulin concentrations tended to be higher in goats treated with glycerol ($P = 0.08$). In conclusion, an oral drench of 100 mL of glycerol at the time of progestin withdrawal and in the first 6 days of the estrous cycle did not increase the ovulation rate, prolificacy, or pregnancy rate in goats.

Keywords: Ovulation rate; Prolificacy; Glycerol; Insulin; Goats.

Received: 2015-10-12
 Accepted: 2016-03-16
 Published: 2016-03-28

Additional information and declarations
 can be found on page 8

© Copyright 2016
 Ubaldo Aguilar *et al.*

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Introduction

An increase in the ovulation rate and prolificacy in small ruminants has been achieved in an efficient way through hormone treatments and by increasing the energy content in the diet (flushing). Although the flushing mechanism is not yet fully understood, the evidence indicates that its effects are produced at the ovarian level; furthermore, they are independent of gonadotropin concentrations and are associated with increases in the blood glucose and insulin levels (Downing *et al.*, 1995; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004; Dupont *et al.*, 2014).

In sheep, short-term supplementation with lupin grain, a legume with a high metabolizable energy and protein content, can increase ovulation rates. Short-term supplementation with lupin grain stimulates folliculogenesis and increases ovulation rates, without inducing changes in body weight and condition (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Glucose and insulin may influence the ovulation rate by stimulating follicle development, resulting in a higher number of follicles capable of responding to gonadotropin stimulus (Gutiérrez *et al.*, 1997; Viñoles *et al.*, 2005). Furthermore, glucose and glucosamine stimulate follicle steroidogenic capacity by increasing insulin-like growth factor type I (IGF-I) activity (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004). Studies performed in goats show that an increase in insulin, either induced by diet or by insulin administration, increases the ovulation rate (Suguna *et al.*, 2009; Zabuli *et al.*, 2010).

The administration of glycogenic solutions can cause an increase in the blood glucose and insulin concentrations. In sheep, short-term treatments with glycerol and propylene glycol have been used to increase ovulation rates. Rodríguez Iglesias *et al.* (1996) were able to increase the ovulation rate in seasonally anovulatory ewes through the oral administration of 100 mL of a glycerol and propylene glycol solution, which were administered immediately before ram exposure. Gutiérrez *et al.* (2011) observed increased serum glucose concentrations, insulin, and ovulation rates with a single oral dose of 300 mL of glycerol during the induction of luteolysis with PGF2 α in Pelibuey sheep. In the same study, a similar effect on the ovulation rate with a single oral dose of 100 mL of glycerol was achieved.

Moreover, insulin promotes early embryonic development. *In vitro* insulin exerts a mitogenic and an antiapoptotic effect on embryos (Byrne *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2003), resulting in an increased proportion of embryos reaching the blastocyst stage. Additionally, high insulin concentrations negatively affect embryonic development in cattle (Fouladi-Nashta *et al.*, 2006) and sheep (Carrera-Chávez *et al.*, 2014). Furthermore, a positive effect from insulin on luteal function has been observed. In a goat study, insulin was associated with higher concentrations of progesterone during pregnancy (Suguna *et al.*, 2009). High levels of progesterone are associated with accelerated embryonic development (Garret *et al.*, 1988), which could translate into fewer embryonic losses. In dairy cows, the administration of 1 L of oral glycerol during the first 6 days post-insemination increases blood insulin levels and increases the pregnancy rate (Ortega *et al.*, 2010). Therefore, this study tested whether the oral administration of 100 mL of glycerol, at the time of progestin removal and in the first 6 days of the estrous cycle, increased the ovulation rate, prolificacy, and pregnancy rate in goats.

Materials and methods

Location

This study was conducted in an experimental station at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), located in Tequisquiapan, Querétaro, at a latitude of 20°31'21" N and at 1881 m above sea level. The regional climate is temperate and semi-arid, with an average temperature of 17.5° C and an average annual rainfall of 512 mm (García, 1981). The experiment was carried out from September to November, which corresponds to the reproductive season of goats in Mexico (Arvizu *et al.*, 1995).

Animals

In this experiment, 129 crossbreed (Boer-Alpine French) cycling goats (22 doelings and 107 does varying in parity) with a body condition score between 2 and 3 were included (Russel *et al.*, 1969). The goats were confined and fed a diet based on alfalfa hay, corn silage, and concentrate according to NRC requirements. This experiment was approved by the Consejo Académico del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal from UNAM.

Treatments

In all goats, an intravaginal sponge impregnated with 45 mg of fluorogestone acetate (FGA; Chronogest; MSD Animal Health, Mexico; Intervet México, S.A. de C.V., Huixquilucan, Estado de México, México) was inserted and remained *in situ* for 12 days. When the sponge was removed, a luteolytic dose of sodium cloprostenol (Celosil; MSD Animal Health, Mexico) was administered. Upon sponge withdrawal, the goats were randomly assigned to one of the following treatment groups: the glycerol (n = 65) group, which received an oral drench of 100 mL of glycerol repeated on days 0, 2, 4, and 6 following estrus (estrus = day 0), and the control (n = 64) group, which did not receive glycerol. Males fitted with an apron performed estrus detection. Females in estrus were mated to males of proven fertility.

Between days 8 and 12 post-mating, the ovulation rate was determined via a transrectal ultrasound exam by counting the number of corpora lutea; for this purpose, a 7.5 MHz linear transducer (Aloka, Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used, which was adapted to a rigid support to allow for handling (Gutierrez *et al.*, 2011). The pregnancy rate was determined by ultrasonographic pregnancy diagnosis on day 40 after service. Prolificacy was determined at birth (Fig. 1).

Blood sampling and sample processing

To determine blood levels of progesterone and insulin, 6 goats were treated with oral glycerol and 5 controls were randomly sampled. Blood samples for progesterone quantification were taken daily between days 1 and 17 of the estrous cycle. Two goats in the control group presented with short cycles; therefore, they were not included in the progesterone statistical analysis. On day 4 of the estrous cycle, sampling was conducted in order to determine blood insulin levels induced by the oral administration of glycerol. The first sample was taken before treatment (0 h), and the next samples were taken at 2, 4, 8, and 12 h after the glycerol drench.

Blood samples (10 mL) were obtained by puncture of the jugular vein using Vacutainer® tubes containing 100 µL of sodium citrate. The blood samples were centrifuged at 1500 x g for 10 min to separate the plasma, which was subsequently stored at -20 °C until analysis. The progesterone and insulin concentrations were determined by solid-phase radioimmunoassay (Coat-A-Count®, RIA kit, DPC; USA). In the case of progesterone, the assay sensitivity was 0.1 ng/mL with an intra-assay variation coefficient of 4.2%, while the insulin sensitivity was 0.052 ng/mL, with an intra-assay variation coefficient of 3.3%.

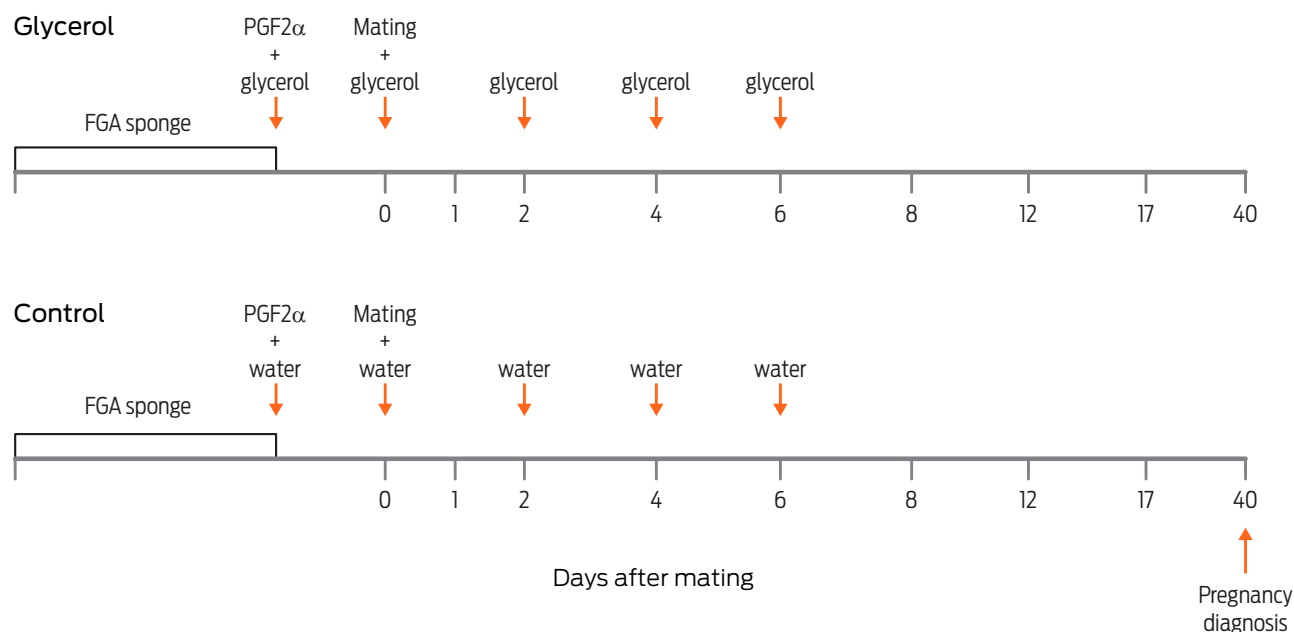


Figure 1. A schematic overview of the treatments.

Statistical analysis

A logistic regression model was used to determine the effect of oral glycerol treatment on the percentage of goats with multiple ovulations and multiple births. Likewise, the effect of parity (primiparous and multiparous) and its interaction with treatment was tested by logistic regression [SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC)]. The ovulation rate and prolificacy were compared by the Mann-Whitney U test, in which the effect of treatment and its interaction with parity were considered. The differences in the progesterone and insulin concentrations between treatments were tested by ANOVA for repeated measurements; the model included treatment, time, and their interactions. In all cases, $P < 0.05$ was considered to be significantly different and $P \leq 0.10$ was considered to be a tendency.

Results and Discussion

The oral administration of 100 mL of glycerol at the time of progesterone withdrawal did not increase the ovulation rate, and the proportion of goats with multiple ovulations or multiple births was similar between treatments (Tables 1 and 2). The ovulation rate [glycerol= 1.84 ± 0.64 vs control= 1.80 ± 0.72 (mean $\pm$ standard deviation)] and the prolificacy [glycerol= 1.58 ± 0.61 vs control= 1.60 ± 0.64 (mean $\pm$ standard deviation)] were similar between treatments. These results are different from those observed in sheep by Rodríguez Iglesias *et al.* (1996) and Gutiérrez *et al.* (2011). The reason the treatment did not have a favorable effect on the ovulation rate may be related to the metabolic response to the oral glycerol doses. The 100 mL glycerol dose was determined based on the results obtained in sheep by Gutiérrez *et al.* (2011); in their study, the administration of 100 mL glycerol caused an increase in the ovulation rate similar to the one obtained with 300 mL. For this reason, the administration of 100 mL was chosen. In the present study, serum

Table 1. Percentage of goats with multiple ovulations that received an oral drench of 100 mL glycerol.

Variable	Class	Percentage of multiple ovulation	Odds ratio	95% confidence interval	P-value
Treatment	Control	64 (29/45)	1.00		
	Glycerol	71 (35/49)	1.73	0.66-4.49	0.260
Parity	Primiparous	31 (5/16)	1.00		
	Multiparous	75 (59/78)	7.56	2.25-25.31	0.001

Table 2. Percentage of goats kidding more than one kid that received an oral drench of 100 mL glycerol.

Variable	Class	Percentage of multiple births	Odds ratio	95% confidence interval	P-value
Treatment	Control	56 (26/46)	1.00		
	Glycerol	52 (25/48)	0.95	0.40-2.20	0.906
Parity	Primiparous	27 (4/15)	1.00		
	Multiparous	59 (47/79)	4.00	1.16-13.80	0.002

insulin concentrations were not affected by the treatment ($P = 0.11$), but there was an interaction between the treatment and time ($P = 0.08$). Thus, insulin concentrations tended to be higher within 2 and 4 h post-treatment (Fig. 2). Likely, this slight increase in insulin concentrations was not enough to improve the ovulation rate. The cause of the variation in response to the same glycerol dose observed between sheep and goats is unknown. Studies evaluating glycogenic solutions have been performed in sheep and cattle, but not in goats (Rodríguez-Iglesias *et al.*, 1996; Ortega *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2011). Although these 3 species are ruminants, they present differences in their digestive function and their use of forages. Goats have physiological adaptations that allow them to leverage high fiber feeds more efficiently (Silanikove, 2000). Therefore, they may be less sensitive to variations in the quality and quantity of offered feeds. Oral glycerol is used as a substrate in rumen fermentation from which propionate can be obtained. However, it can also be absorbed directly as glycerol through the rumen mucosa, which will be converted later into glucose in the liver (Trabue *et al.*, 2007). Although this metabolic pathway is the same in ruminants, its efficiency in triggering insulin secretion may be different between species; this could explain, in part, the success of the treatment in increasing the ovulation rate in sheep as well as its failure in goats. The results of this study promote the development of future studies in goats to evaluate different glycerol doses, until the dose that triggers an optimal response in serum insulin is determined.

Furthermore, this study proposed that the oral administration of glycerol during the first days of embryo development (days 0, 2, 4, and 6 of the estrous cycle) favors embryonic survival, which would increase the proportion of pregnant goats and

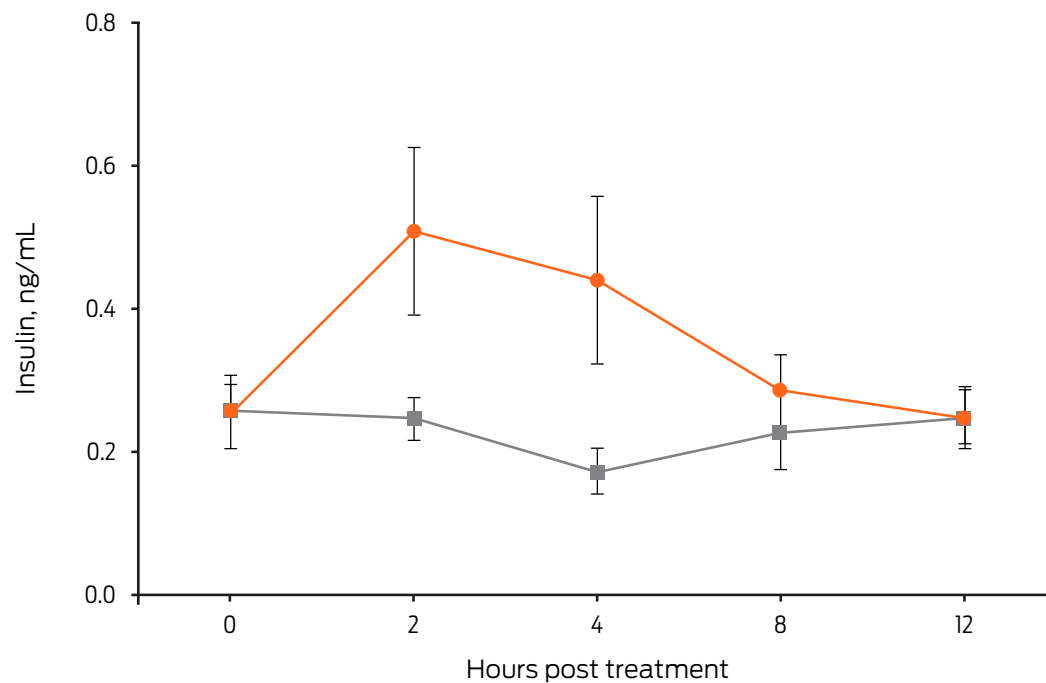


Figure 2. Average insulin concentrations ($\pm$ standard error) in goats treated with 100 mL of glycerol (—●—) and controls (—■—). Treatment by time interaction: $P = 0.08$.

prolificacy. This hypothesis was based on the expected effect of glycerol on insulin concentrations and the effects of insulin on embryonic development. Studies performed *in vitro* and *in vivo* show that insulin improves embryonic development by increasing cell proliferation and decreasing apoptosis (Augustin *et al.*, 2003; Suguna *et al.*, 2009). Meanwhile, low insulin concentrations adversely affect embryonic development and interferon tau production (Thatcher *et al.*, 1995). Furthermore, in dairy cows, an increase in insulin concentrations induced by the oral administration of 1 L of glycerol during the first 6 days of embryonic development (days 0, 2, 4, and 6) has been shown to improve pregnancy rates (Ortega *et al.*, 2010). In the present study, however, the pregnancy rate (glycerol = 88 vs control = 85%) and the proportion of multiple births were similar between treatments ($P > 0.05$; Table 2). The lack of effect on prolificacy and pregnancy rate observed in this study was probably due to the marginal increase in insulin concentrations after the oral administration of 100 mL of glycerol. Furthermore, the pregnancy rate obtained in both groups was high, which makes it more difficult to identify a positive effect from any treatment aimed at improving fertility. Parity was observed to have an effect on ovulation rate and prolificacy; however, there was no interaction between the treatment and parity (Tables 1 and 2; $P > 0.1$).

The administration of oral glycerol during the first days of the estrous cycle may favor embryonic development and conception rate by increasing serum progesterone concentrations. This hypothesis is based on studies in cattle in which insulin increases circulating progesterone concentrations (Spicer y Echternkamp, 1995; Cooke *et al.*, 2012). In this study, nonetheless, progesterone concentrations between 1 and 17 days post-mating were similar between treatments, and no interaction was observed between the treatment and time ($P > 0.05$; Fig. 3).

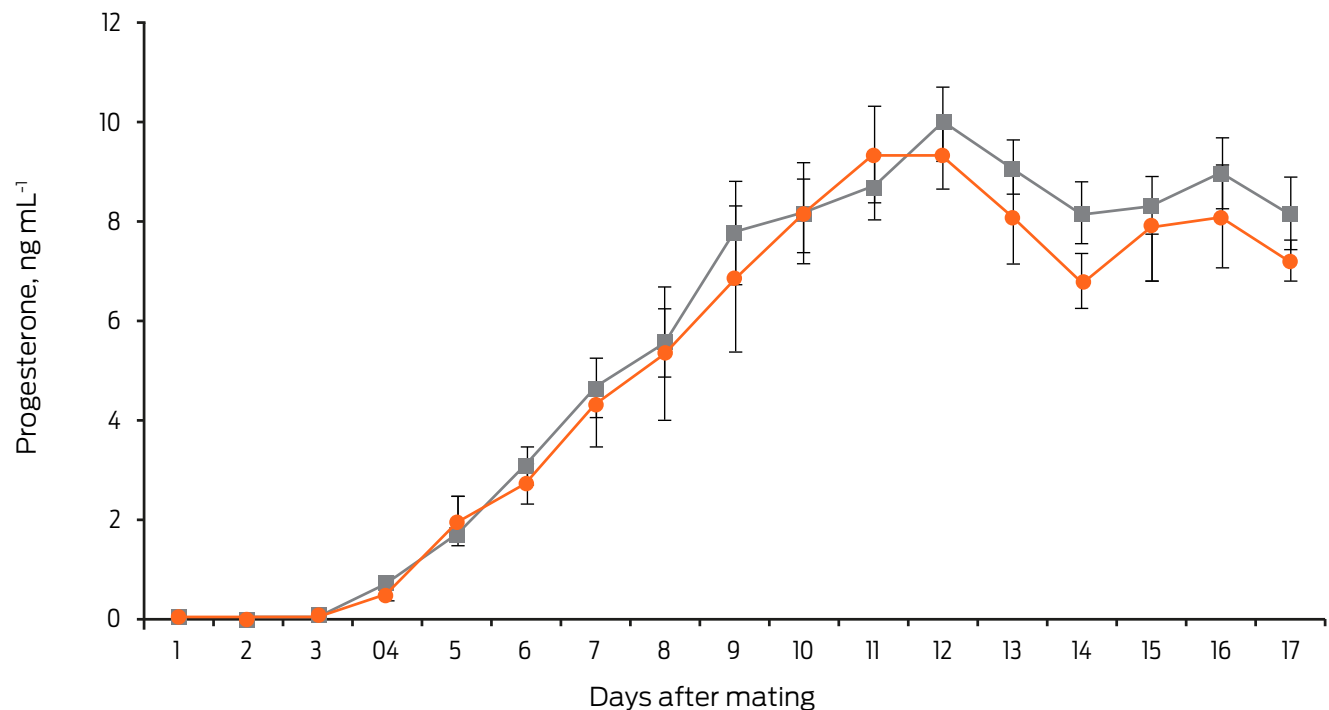


Figure 3. Average concentrations of progesterone ($\pm$ standard error) in goats treated with 100 mL of oral glycerol (■) and controls (●) ($P > 0.05$).

The good body condition of the goats used in this study, as well as the season in which the treatment was applied, may have influenced the lack of a positive response to glycerol administration. The goats received a diet that met the NRC requirements, and they had a body condition between 2 and 3 at the beginning of the experiment, which is reflective of the conditions associated with a high pregnancy rate and high prolificacy and are similar to those obtained consistently within the flock. Conversely, this study was completed during the height of the reproductive period, which contributed to the excellent response in fertility. Future experiments should be conducted in conditions in which the fertility and prolificacy are diminished, such as in cyclicity induction programs during anestrus or in marginally nourished goats; in these circumstances, the supplementation proposed in this study may improve fertility. Treatments exist that do not increase pregnancy rates globally, but rather do so in subgroups of animals. In a previous study conducted by our group, for example, bovine recombinant somatotropin only increased pregnancy rate in goats in anestrus, as well as only increased prolificacy in primiparous goats, who naturally tend to have a lower pregnancy rate and prolificacy (Hernández y Gutiérrez, 2012).

Conclusions

In conclusion, the oral administration of 100 mL of glycerol at the time of progestin withdrawal and in the first six days of the estrous cycle did not increase the ovulation rate, prolificacy, or pregnancy rate in goats.

Funding

Part of this study was funded by project PAPIIT IN22235 of UNAM, Mexico.

Acknowledgments

The authors are grateful to the workers and technicians of the experimental station for providing the facilities, animals, and constant support during the study.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

Ubaldo Aguilar performed the experiment and analyzed the results.

Yesmín Domínguez performed the experiment.

Joel Hernández Cerón and Carlos G. Gutiérrez designed the experiment, analyzed the results and wrote the manuscript.

References

- 1) Arvizu R, Hernández Cerón J, Alberti A, Porras A, Valencia J. 1995. Inicio de la actividad ovárica posparto y características de la primera ovulación de cabras criollas paridas en dos épocas del año. *Avances en Investigación Agropecuaria* 4:9-15.
- 2) Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 126:91-99.
- 3) Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development* 62:489-495.
- 4) Carrera-Chávez JM, Hernández-Cerón J, López-Carlos MA, Lozano-Domínguez RR, Molinar F, Echavarría-Cháirez FG, Bañuelos-Valenzuela R, Aréchiga CF. 2014. Superovulatory response and embryo development in ewes treated with two doses of bovine somatotropin. *Animal Reproduction Science* 151: 105-111.
- 5) Cooke RF, Cappellosa BI, Reis MM, Bohnert DW, Vasconcelos JL. 2012. Plasma progesterone concentration in beef heifers receiving exogenous glucose, insulin, or bovine somatotropin. *Journal of Animal Science* 90:3266–3273.
- 6) Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. 1995. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 146:403-410.
- 7) Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. 2014. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 8:1031–1044.
- 8) Fouladi-Nashta AA, Campbell KHS. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction* 131; 449-460.
- 9) García E. 1981. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. 5ª edición. México, D. F., México: Instituto de Geografía, UNAM.
- 10) Garret JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 84:437-446.

- 11) Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. 1997. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science* 75:1876-1884.
- 12) Gutierrez CG, Ferraro S, Martinez V, Saharrea A, Cortez C, Lassala A, Basurto H, Hernandez Ceron J. 2011. Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Acta Scientiae Veterinariae* 39 (Suppl 1):305-316.
- 13) Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia* 47: 35-45. 2013.
- 14) Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction* 128:747-756.
- 15) Ortega LA, Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG. 2010. La administración oral de glicerol después de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein. *Técnica Pecuaria en México* 48:69-74
- 16) Rodríguez-Iglesias RM, Ciccioi NH, Irazoqui H, Giglioli C. 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Animal Reproduction Science* 44:211-221.
- 17) Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72:451-454.
- 18) Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M, Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development* 46:339-354.
- 19) Silanikove N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research* 35:181-193.
- 20) Spicer, LJ, Echternkamp SE. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 12:223-245.
- 21) Suguna K, Mehrotra S, Agarwal SK, Hoque M, Shanker U, Singh SK, Varshney VP. 2009. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function, embryo/fetal development during pregnancy in goats. *Animal Reproduction Science* 111:202-213.
- 22) Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of reproduction and Fertility* 49 (Suppl.), 15-28.
- 23) Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen MA, Reilly PJ. 2007. Ruminal Fermentation of Propylene Glycol and Glycerol *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7043-7051
- 24) Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129:299-309.
- 25) Zabuli J, Tanaka T, Lu W, Kamomae H. 2010. Intermittent nutritional stimulus by short-term treatment of high-energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cyclic goats. *Animal Reproduction Science* 122:288-293.