Niveles sanguíneos de cortisol y receptores a glucocorticoides en hígado y placenta de cabras en diferentes etapas de la gestación

Blood levels of cortisol and glucocorticoid receptors in liver and placenta of goats at different stages of gestation

Gabriela López* Verónica Lona Díaz* Brenda Anguiano Serrano*
Maricela Luna Muñoz** Tomás Morato Cartagena* Carlos Manuel Romero Ramírez*

Abstract

In order to analyze the temporal relationship between cortisol levels and glucocorticoid receptors (GR) in placenta and the possible influence in noninfectious abortion in goats, changes in GR in livers of the foetuses and mothers livers and in placenta together with foetal and maternal cortisol levels under stress conditions in non-pregnant (n = 5) and pregnant goats (n = 24) were recorded. The pregnant goats were five on days 40-50 of gestation (40-50 d), six on days 51-75, four on days 76-100, three on days 101-125, and six in more than 125 days of gestation. GR values in the placenta and maternal serum cortisol levels, measured by competitive binding methods, decreased from 10.4 ± 2.7 and 174.3 ± 59.1, in the group 40-50 d to 6.1 ± 2.3 fmol/mg of protein and 79.1 ± 66.1 nmol/l in the 76-100 d group, respectively. Values then increased, reaching the highest values ($P \leq 0.05$) detected in this study (18.3 ± 2.7 and 659.6 ± 76.3) in the 101-125 d group followed by a decrease of 11.6 ± 2.1 fmol/mg protein and 231.6 ± 54.0 nmol/l in the +125 d group. Progesterone was bound competitively to placental GR. However, its binding values decreased in the 101-125 d group. Reciprocal profiles were found in maternal and fetal liver GR. These data suggest that goats have innate mechanisms for abortion that occurs in case of life-threatening conditions saving mother's life and giving opportunity for new pregnancies, allowing thus the survival of this species.

Key words: GLUCOCORTICOID RECEPTORS, CORTISOL, STRESS, ABORTION PHISIOLOGY, PLACENTA, GOATS.

Resumen

Para analizar la relación temporal entre los niveles de cortisol y los receptores a glucocorticoides (GR) en la placenta y su posible influencia en el aborto no infeccioso de las cabras, se registraron los cambios en el cortisol sanguíneo y en los GR del hígado de cabras adultas no gestantes (n = 5) y, además de los anteriores, en el hígado fetal y la placenta junto con los niveles de cortisol fetal de cabras gestantes (n = 24) bajo condiciones de estrés. Las cabras gestantes fueron: cinco de 40 a 50 días de gestación, seis de 51 a 75, cuatro de 76 a 100, tres de 101 a 125 y seis con más de 125 días de gestación. Los valores de GR en la placenta y los niveles de cortisol materno medidos por unión competitiva, decrecieron desde 10.4 ± 2.7 y 174.3 ± 59.1 en el grupo 40-50 d a 6.1 ± 2.3 fmol/mg proteína y 79.1 ± 66.1 nmol/l en el grupo 76-100 d, respectivamente. Ambos valores se incrementaron en el grupo 101-125 d, hasta alcanzar los más altos ($P \leq 0.05$) detectados en este estudio (18.3 ± 2.7 y 659.6 ± 76.3) seguidos por una disminución a 11.6 ± 2.1 fmol/mg proteína y 231.6 ± 54.0 nmol/l en el grupo +125 d. Además, la progesterona se unió competitivamente a los GR placentarios; sin embargo, su unión disminuyó en el grupo 101-125 d. Los GR de los hígados materno y fetal presentaron un perfil inverso. Estos resultados permiten sugerir que las cabras cuando se encuentran en situaciones que amenazan su vida y la del feto tienen mecanismos innatos para abortar, salvando la vida de la madre y dando la oportunidad de una nueva gestación que permita la sobrevivencia de la especie.

Palabras clave: RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES, CORTISOL, ESTRÉS, FISIOLOGÍA DEL ABORTO, PLACENTA, CABRAS.

Recibido el 29 de julio de 2011 y aceptado el 23 de abril de 2012.

*Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, 09340, México, DF.

**Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Juriquilla, 76230, Querétaro, México.

Responsable de correspondencia: Carlos M. Romero Ramírez, teléfono: (55) 5804 4708, fax: (55) 5804 4930, correo electrónico: crr@xanum.uam.mx

Nota: El presente trabajo forma parte de la tesis de Maestría en Biología Experimental del primer autor, quien recibió una beca Conacyt número 91611 y una beca para estudios de posgrado del personal académico de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Introduction

Goat is a species prone to abortion, and although infectious diseases are responsible for a high proportion of the abortions, there are other factors that increase the abortion in goats.[1,2] Van Rensburg[3] described the association of habitual abortion in Angora goats with higher cortisol levels, and Wentzel *et al.*[4] found hyperplasic adrenal glands in this type of goats. Abortion in goats was also induced by administration of estradiol-17β to the mother[5] or by glucocorticoid into the fetus.[6] An association between increases in maternal cortisol and abortion in the goat at days 102 to 134 of gestation has also been reported.[7]

It is well established that the increased fetal cortisol is the signal that triggers labor in the goat[8] and other mammalian species.[9-11] Flint *et al.*[12] demonstrated that infusion of dexamethasone into goat fetuses induces delivery, converts progesterone to 17α-hydroxyprogesterone and to estrogens by initial activation of placental 17α-hydroxylase. France *et al.*[13] induced premature labor in ewes by infusion of dexamethasone into the fetus and detected an increase in the activity of the placental steroid 17α-hydroxylase and aromatase enzymes. They also demonstrated the concomitant increments in cytochrome $P\text{-}450_{17\alpha}$ and mRNA for the 17α-hydroxylase in placental microsomal preparations.

Glucocorticoid receptors (GR) are the mediators to glucocorticoids at their target organs and their number, affinity and ligand disposal are related to the response capacity of the target.[14] GR changes during gestation have been documented in ovine placenta and there are detected around day 50 of gestation, increase by mid-gestation (90-129 d) and decrease at the end of it (135-147 d).[15] Using immunohistochemical methods it has been demonstrated elevated GR levels in bovine placentomes when parturition was induced by cloprostenol.[16-18] By same methods it was also demonstrated the increase of the GR in sheep placenta when parturition was induced by infusion of the fetus with cortisol.[19]

Although is well known that transportation of pregnant goats under fasting increases the blood cortisol levels in the mother and their offspring,[20,21] there are no studies that correlate the high cortisol levels in the mother with expression of the GR under these conditions. On this purpose, the effect of transportation under fasting at different stages of gestation was studied measuring, in both mother and fetus, the levels of GR and cortisol, as well as of other hormones proper of gestation: progesterone, 17α-hydroxyprogesterone, and 17β-estradiol in maternal serum.

Introducción

La cabra es una especie propensa al aborto, y aunque muchas enfermedades infecciosas son responsables de una alta proporción de ello, hay otros factores que inducen los abortos en las cabras.[1,2] Van Rensburg[3] describió la asociación del aborto habitual en las cabras de Angora con hipercortisolismo, y Wentzel *et al.*[4] encontraron glándulas adrenales hiperplásicas en este tipo de cabras. El aborto en la cabra también ha sido inducido por la administración de 17β-estradiol a la madre,[5] o de glucocorticoides al feto.[6] También se ha informado de una asociación entre el incremento de cortisol materno y aborto en cabras entre los días 102 a 134 de gestación.[7]

Está bien establecido que la elevación del cortisol fetal es la señal que induce el trabajo de parto en la cabra[8] y en otras especies de mamíferos.[9-11] Flint *et al.*[12] demostraron que la infusión de dexametasona en fetos de cabra induce el parto por la conversión de la progesterona a 17α-hidroxiprogesterona y a estrógenos por activación inicial de la 17α-hidroxilasa placentaria. France *et al.*[13] indujeron el parto prematuro en ovejas mediante la infusión de dexametasona aplicada al feto, con lo cual, se observó un incremento en la actividad de las enzimas placentarias 17α-hidroxilasa y aromatasa. También demostraron el incremento concomitante en el citocromo $P450_{17\alpha}$ y en el ARNm para la 17α-hidroxilasa en preparaciones de microsomas de placenta ovina.

Los receptores a glucocorticoides (GR) son los mediadores entre los glucocorticoides y sus órganos blancos, y se ha determinado que su número, afinidad y disponibilidad del ligando, están relacionados con la capacidad de respuesta del órgano blanco.[14] Los cambios en los GR durante la gestación han sido documentados en la placenta ovina; éstos son detectados alrededor del día 50 de gestación, se incrementan alrededor de la mitad de la gestación (90-129 días) y disminuyen hacia el final (135-147 días).[15] Con métodos inmunohistoquímicos se ha demostrado que los GR se elevan en los placentomas bovinos cuando el parto es inducido con cloprostenol.[16-18] Por estos mismos métodos también se demostró el incremento de los GR en la placenta de ovejas cuando se indujo el parto por administración de cortisol al feto.[19]

Aunque es bien conocido que el transporte de cabras gestantes bajo ayuno prolongado incrementa los niveles de cortisol sanguíneo en la madre y las crías,[20,21] no existen estudios que relacionen los altos niveles de cortisol detectados en la madre y la expresión de los GR en estas condiciones. Con este propósito, se estudió el efecto del transporte de los niveles de cortisol y GR en la madre y en el feto, en diferentes estadios de la gestación bajo ayuno, así como sobre hormonas propias de

Material and methods

Animals and samples

Adult goats were collected by herd dealers and transported under stress and fasting for at least 36 hours; in addition to stress prior to being slaughtered. All animals were slaughtered at noon time according to the NOM-033-200-1995[22] when samples and other data were obtained.

Twenty-nine crossbred goats selected at random were studied. Time of gestation was calculated on basis of fetal age that was determined by weight, crown-rump length and other morphologic parameters.[23]

From the 29 animals, 5 were non-pregnant goats (npg). From the 24 pregnant, and according to gestation age, several groups were studied: 40-50 days of gestation (40-50 d; n=5) , 51-75 days of gestation (51-75 d; n=6), 76-100 days of gestation (76-100 d; n=4), 101-125 days of gestation (101-125 d; n= 3) and 126 and longer days of gestation (+126 d; n=6).

Blood samples were obtained from the jugular of the doe and from the umbilical cord of the fetus and centrifuged at 1000 *g* for 15 minutes and recovered serum was stored at -20°C until assay. Maternal and fetal liver samples and placental cotyledons were obtained immediately after death, washed with cold 0.9% NaCl followed by 0.3 M sucrose solution, transported at -196°C in liquid nitrogen containers and, thereafter, stored in the laboratory at -70°C until further analysis.

Cytosol Protein Fraction and sample preparation

Frozen tissues were pulverized while immersed in liquid nitrogen and subsequent processes were performed at 4°C. Powdered tissue was homogenized in 3 volumes (W/V) of Tris-HCl buffer pH 7.4 (10 mM Tris HCl, 1.5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.1 M sodium molybdate and 10% glycerol). Homogenates were centrifuged at 1000 *g* for 10 minutes and the supernatant centrifuged at 105,000 *g* for one hour.[24] Last supernatant was used for the assays and for the measurement of total protein by the Bradford method.[25]

Measurement of glucocorticoid receptor binding capacity

Incubations (triplicates) were carried out using 2 mg of cytosol protein in 0.6 ml of Tris-HCl buffer pH 7.4, adding 0.4 pmol of ^{3}H-dexamethasone (46 000 dpm of 6,7-^{3}H-dexamethasone, specific activity [SA] 47.0 Ci/mmol), and after mixing, the samples were incubated at 4°C during 18 hours. Non-specific binding to GR was determined by incubating ^{3}H-dexamethasone, cyla gestación: progesterona, 17α-hidroxiprogesterona y 17β-estradiol en el suero materno.

Material y métodos

Animales y muestras

Las cabras adultas fueron recolectadas por introductores de ganado, estuvieron sujetas a ayuno por lo menos 36 horas, además del estrés de transporte asociado con el sacrificio. Para obtener las muestras y otros datos, los animales fueron sacrificados conforme a la NOM-033-200-1995,[22] a las 12 horas en todos los casos.

Se estudiaron 29 cabras mestizas seleccionadas al azar. El tiempo de gestación se estimó con base en la edad fetal, la cual fue determinada por el peso corporal, la longitud de la coronilla a la cadera y otros parámetros morfológicos.[23] De las 29 cabras, 5 fueron no gestantes (npg); de las 24 gestantes, con base en el tiempo de gestación, se integraron los siguientes grupos: de 40 a 50 días de gestación (40-50 d; n = 5), de 51 a 75 días de gestación (51-75 d; n = 6), de 76 a 100 días de gestación (76-100 d; n = 4), de 101 a 125 días de gestación (101-125 d; n = 3) y de 126 o más días de gestación (+126 d; n = 6).

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular de las cabras y del cordón umbilical de los fetos, se centrifugaron a 1000 *g* por 15 minutos y el suero obtenido se congeló a -20°C hasta su ensayo. Las muestras de hígado materno y fetal y los cotiledones placentarios se recolectaron inmediatamente después del sacrificio, se lavaron con solución de NaCl 0.9% fría, seguida de una solución de sacarosa 0.3 M, se transportaron a -196°C en nitrógeno líquido y se mantuvieron en el laboratorio a -70°C hasta su análisis.

Proteína en la fracción citosólica y preparación de las muestras

Los tejidos congelados fueron pulverizados mientras se mantenían en nitrógeno líquido, y los procesos subsecuentes se realizaron a 4°C. Los tejidos pulverizados se homogeneizaron en tres volúmenes (P/V) de solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.4 (10 mM tris HCl, 1.5 mM EDTA, 2mM ditiotreitol, 0.1 M molibdato de sodio y 10% de glicerol), y se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 minutos, y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 105,000 *g* por una hora.[24] El sobrenadante final se utilizó para los ensayos y para la medición de la proteína total por el método de Bradford.[25]

Medición de la capacidad de unión del receptor a glucocorticoides

Las incubaciones se realizaron por triplicado utilizando 2 mg de proteína citosólica en 0.6 ml de solución

tosol protein and an excess of unlabeled dexamethasone (96 pmol/tube). For unspecific binding to GR calculation in the incubation system, other tubes were incubated without cytosol protein. Free- and bound-radioactivity were separated by adding 0.2 ml of dextran-coated charcoal (0.075 - 0.75%) in Tris-HCl buffer pH 7.4, mixing and allowing it to settle for one hour at 4°C and centrifuged at 1200 *g* for 15 min. The supernatant fractions were transferred to glass counting vials, added with 5 ml of scintillation fluid, vortexed and the radioactivity content measured by liquid scintillation spectrometry. Specific GR binding was calculated after correction for unspecific binding and it was expressed as fmol/mg of protein.

Progesterone competitive binding assay for ^{3}H-dexamethasone sites in placenta

Assay was performed using three sets (triplicates) of placental cytosol. The first one for total binding for ^{3}H-dexamethasone measurement, the second for unspecific binding, and the third for binding displacement by unlabeled progesterone. All tubes were added with 2 mg of cytosol protein and ^{3}H-dexamethasone (0.4 pmol, 50,000 dpm). The second set was added with 96 pmol of dexamethasone and the third one was added with unlabeled progesterone (96 pmol). All sets were incubated at 4°C during 18 hours followed by the addition of 0.2 ml of dextran-charcoal mixture (0.075-0.75%) for elimination of unbound steroids after allowing them to stay one hour at 4°C before centrifugation at 1200 *g*. The supernatant fractions were transferred to glass counting vials, added with 5 ml of scintillation fluid, vortexed and counted by liquid scintillation spectrometry. Competitive binding of progesterone, corrected by unspecific binding, was calculated as compared to that of total binding of dexamethasone and expressed as percentage (%).

Hormonal determinations

Cortisol was measured in 0.5 ml of serum that was extracted with methylene chloride (1:10, v/v); the hydrosoluble fraction was eliminated and solvent was evaporated to dryness. Lipid-soluble dry extract was suspended in 2 ml of phosphate buffer (0.01 M, pH 8.0). Assay was carried out in triplicates of 0.5 ml by a specific competitive protein-binding assay using ^{3}H-cortisol (1,2,6,7-^{3}H-hydrocortisone, SA 70.0 Ci/mmol), sheep serum (free of cortisol) and cortisol for the standard analytical curve. Values were calculated after corrections for unspecific binding, experimental losses, and were expressed as nmol/l.[26] Intra- and inter-assay coefficients of variation were 3 and 14%, respectively.

amortiguadora de Tris-HCl pH 7.4, agregando 0.4 pmol de ^{3}H-dexametasona (46 000 dpm de 6,7-^{3}H-dexametasona, actividad específica (AE) 47.0 Ci/mmol) y después de mezcladas se incubaron a 4°C durante 18 h. La unión inespecífica a los GR se determinó por incubación de ^{3}H-dexametasona, proteína citosólica y un exceso de dexametasona no radiactiva (96 pmol por tubo). Para calcular la unión inespecífica del sistema de incubación se utilizaron tubos incubados sin proteína citosólica. La radiactividad libre y unida se separó por adición de 0.2 ml carbón-dextran (0.75-0.075%) en solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.4, se mezcló y se dejó reposar una hora a 4°C y se centrifugó a 1200 *g* durante 15 min. Los sobrenadantes se transfirieron a viales de vidrio, agregados con 5 ml de líquido de centelleo, mezclados vigorosamente; el contenido radiactivo se midió por espectrometría de centelleo líquido. La unión específica a los GR se calculó después de la corrección para la unión inespecífica y se expresó como fmol/mg de proteína.

Desplazamiento de la unión receptor-^{3}H-dexametasona por la progesterona en placenta

Se utilizaron tres series de tubos, en la primer serie se calculó la unión total de ^{3}H-dexametasona, en la segunda, la unión inespecífica, y con la tercera, la unión a ^{3}H-dexametasona en presencia de progesterona. A las tres series de tubos se agregaron 2.0 mg de proteína total citosólica y ^{3}H-dexametasona (0.4pmol, 50 000 dpm); a la segunda serie se agregaron, además, 96 pmol de dexametasona; y, a la tercera serie, progesterona (96,000 fmol). El ensayo se incubó a 4°C durante 18 horas y después de la incubación se agregaron 0.2 ml de carbón-dextran (0.75-0.075%) para eliminar los esteroides no unidos, los tubos se dejaron reposar una hora a 4ºC, y se centrifugaron a 1200 *g*. El sobrenadante se decantó en viales de conteo, a los que se les agregó 5 ml de líquido de centelleo y fueron mezclados vigorosamente y medidos por espectrometría de centelleo líquido. Después de corregir la unión inespecífica, la unión competitiva de progesterona se calculó comparándola con la unión total y se expresó como porcentaje (%).

Determinaciones hormonales

El cortisol se midió en 0.5 ml de suero que fue sometido a extracción con cloruro de metileno (1:10), la fracción hidrosoluble se eliminó y el solvente se evaporó a sequedad. El residuo de la fracción liposoluble se llevó a suspensión en 2 ml de amortiguador de fosfatos (0.01 M pH 8.0). De la suspensión se realizaron las mediciones por triplicado con 0.5 ml mediante un

Progesterone, 17α-hydroxyprogesterone and estradiol-17β were quantified by extraction of 0.5 ml serum samples with ethyl ether (1:10 v/v) that was evaporated. Dry extracts were suspended in 2.0 ml of buffer and triplicates (0.5 ml) were submitted to radioimmunoassay, using specific antibodies raised in rabbits,[27] labeled steroids (1,2,6,7-^{3}H-progesterone, SA 101.7 Ci/mmol; 1,2,6,7-^{3}H-17α-hydroxyprogesterone, SA 67.0 Ci/mmol and 1,2,6,7,16,17-^{3}H-estradiol-17β, SA 136 Ci/mmol), and standards in known amounts from purified steroids. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Values were corrected for unspecific blanks and for experimental losses and expressed as nmol/l. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 8 and 14% for progesterone; 9 and 12% for 17α-hydroxyprogesterone, 5 and 10% for estradiol-17β, respectively.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error. Statistical differences were determined by one-way ANOVA and Fisher's LSD test.[28] Differences with $P \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Changes in cortisol levels in maternal serum as well as the binding capacity in placental GR (GRp) and hepatic GR (GRh) in the doe are summarized in Figure 1. Circulating levels of serum cortisol in the npg and the 40-50 d goats groups were not significatively different (117.1 ± 58.5 and 174.3 ± 59.1 nmol/l). The GRp values showed tendency to decrease from 10.4 ± 2.7 in the 40-50 d group to 6.1 ± 2.3 fmol/mg of protein in the 76-100 d group. Maternal serum cortisol levels decreased ($P \leq 0.05$) from 174.3 ± 59.1 to 79.1 ± 66.1 nmol/l in the same groups. GRp and cortisol levels were found then increased ($P \leq 0.05$) to 18.3 ± 2.7 fmol/mg of protein and to 659.6 ± 76.3 nmol/l, in the group 101-125 d, the highest ones detected in this investigation. These values later decreased ($P \leq 0.05$) in both, the cortisol levels (231.6 ± 53.9 nmol/l) and the GRp content (11.6 ± 2.2 fmol/mg of protein) in the +125 d group.

The number of binding sites in the GRh of npg goats was similar to that of 40-50 d goats, 16.6 ± 1.4 and 20.0 ±4.2 fmol/mg of protein, respectively. Reciprocal changes in maternal and fetal GRh were observed: maternal GRh decreased progressively ($P \leq 0.05$) from 20.0 ± 4.2 fmol/mg of protein in the 40-50 d group to 3.9 ±4.2 fmol/mg of protein in the 101-125 d group, and then increased ($P \leq 0.05$) to 18.0 ± 3.3 fmol/mg of protein in the +125 d group. Opposite changes in

ensayo de competencia por unión a proteínas usando ^{3}H-cortisol (1,2,6,7-^{3}H-hidrocortisona, AE 70.0/Ci mmol), suero ovino (libre de cortisol) y cortisol para la curva estándar. Los valores se calcularon después de las correcciones para unión inespecífica y pérdidas durante el proceso, y se expresaron como nmol/l.[26] Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 3 y 14%, respectivamente.

La progesterona, la 17α-hidroxiprogesterona y el 17β-estradiol fueron determinados de fracciones de 0.5 ml de suero extraído con éter etílico (1:10), el extracto fue evaporado a sequedad, y el residuo llevado a suspensión en 2.0 ml de amortiguador de fosfatos. Fracciones de 0.5 ml de la suspensión fueron ensayadas por triplicado mediante radioinmunoanálisis, usando anticuerpos específicos obtenidos en conejos,[27] esteroides marcados (1,2,6,7-^{3}H-progesterona, AE 101.7 Ci/mmol; 1,2,6,7-^{3}H-17α-hidroxiprogesterona, AE 67.0 Ci/mmol; y 1,2,6,7,16,17-^{3}H-17β-estradiol, AE 136.0 Ci/mmol), y esteroides purificados como estándares en concentración conocida. La radiactividad se cuantificó por conteo de centelleo líquido. Los valores fueron corregidos para blancos inespecíficos y pérdidas experimentales, y expresados como mmol/l. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 8 y 14% para progesterona, 9 y 12% para 17α-hidroxiprogesterona y 5 y 10% para 17β-estradiol, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron por ANDEVA de una vía y la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.[28] Las diferencias con una $P \leq 0.05$ se consideraron significativas.

Resultados

Los cambios en los niveles de cortisol en el suero materno, así como en los sitios de unión de los GR en la placenta (GRp) y en el hígado (GRh) materno se resumen en la Figura 1. Los niveles de cortisol en el suero de los grupos de cabras npg y de 40-50 d no fueron diferentes significativamente (117.1 ± 58.5 y 174.3 ± 59.1 nmol/l, respectivamente). Los valores de GRp presentaron una tendencia a disminuir desde 10.4 ± 2.7 en el grupo de 40-50 d,hasta 6.1 ± 2.3 fmol/mg de proteína en el grupo de 76-100 d. En los mismos grupos, los niveles de cortisol en el suero materno disminuyeron ($P \leq 0.05$) desde 174.3 ± 59.1 a 79.1 ± 66.1 nmol/l. Los niveles de GRp y cortisol se incrementaron ($P \leq 0.05$) en el grupo de 101-125 d con valores de 18.3 ± 2.7 fmol/mg de proteína y 659.6 ± 76.3 nmol/l,

the fetal GRh were found: they increased progressively (P ≤ 0.05) from 35.2 ± 7.3 fmol/mg of protein in the group of 40-50 d to 82.7 ± 13.5 fmol/mg of protein in the 101-125 d group, and decreased (P ≤ 0.05) to 23.3 ± 10.4 fmol/mg of protein in the +125 d group. Fetal cortisol did not show a particular profile and ranged 35-82 nmol/l in all the groups of pregnant goats (Figure 2).

The profiles of the sex steroids in maternal serum are shown in Figure 3. The serum progesterone concentration decreased gradually (P ≤ 0.05) from 46.1 ± 3.7 nmol/l in the 40–50 d group to 11.7 ± 3.4 nmol/l in the +125 d group. The profiles of serum 17α-hydroxyprogesterone and estradiol-17β did not change significantly in the studied groups and fluctuated within the ranges of 0.79 ± 0.13 to 1.1 ± 0.14 and 0.64 ± 0.20 to 0.81 ± 0.17 nmol/l, respectively. Estradiol-17β levels were higher 1.17 ± 0.17 nmol/l in the group at the end of gestation only (Figure 3). The percentage of binding inhibition of ^{3}H-dexamethasone by progesterone addition in the GRp sites decreased progressively from 77.6 ± 15.9% in the 40-50 d to 42.8 ± 13.0 % in the 101-125 d group (Figure 4).

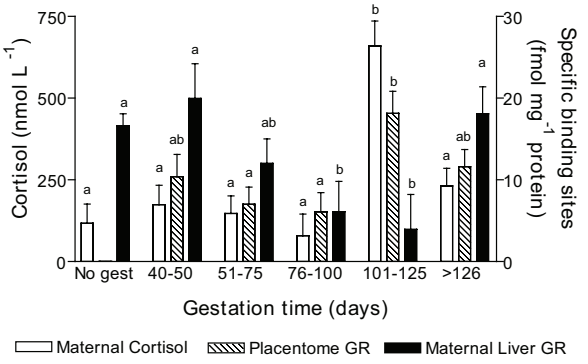

Figura 1. Niveles de cortisol materno y receptores a glucocorticoides en placenta (GRp) e hígado (GRh) materno. Los niveles de cortisol en el grupo de 101-125 días de gestación son altos significativamente. Los GRp disminuyen progresivamente en los grupos conforme avanza la gestación desde el grupo de 40-50 al de 76-100 días, pero incrementan varias veces en el grupo de 101 a 125 días y permanecen altos en el grupo de +125 días. Los valores de GRh maternos disminuyen desde el grupo con gestación temprana al de 101-125 días e incrementan significativamente en el de +125 días de gestación. Se observa una relación inversa entre el cortisol materno y los GRh. Las barras con distinta literal difieren por DMS (P ≤ 0.05).

Figure 1. Cortisol levels and glucocorticoid receptors in placenta (GRp) and maternal liver (GRh). Cortisol levels in the 101-125 days of gestation group are significantly high. GRp decrease progressively in the 40-50 to 76-100 days of gestation groups but increase several fold in the group of 101-125 days and remain high as detected in the group of +125 days. Maternal GRh values decrease from the group in early gestation to the 101-125 days, and then increase significantly in the group of +125 days of gestation. An inverse relationship between maternal cortisol and GRh is noticeable. Bars with different letters differ by LSD (P ≤ 0.05).

los más altos detectados en este estudio. Posteriormente siguió un descenso (P ≤ 0.05), tanto en los niveles de cortisol (231.6 ± 53.9 nmol/l) como en el contenido de los GRp (11.6 ± 2.2 fmol/mg de proteína) en el grupo de +125 d.

El número de sitios de unión de los GRh de cabras npg fue semejante al de cabras con 40-50 d, 16.6 ± 1.4 y 20.0 ± 4.2 fmol/mg de proteína, respectivamente. Se observaron cambios recíprocos en los GRh maternos y fetales. Los GRh maternos decrecieron (P ≤ 0.05) progresivamente desde 20.0 ± 4.2 fmol/mg de proteína en el grupo de 40-50 d a 3.9 ± 4.2 fmol/mg de proteína en el grupo 101-125 d, y luego incrementaron (P ≤ 0.05) a 18.0 ± 3.3 fmol/mg de proteína en el grupo de +125 d. Por el contrario, en los GRh del feto se encontró un incremento (P ≤ 0.05) progresivo desde 35.2 ± 7.3 fmol/mg de proteína en el grupo de 40-50 d a 82.7 ± 13.5 fmol/mg de proteína en el grupo de 101-125 d, y luego decrecieron (P ≤ 0.05) a 23.3 ± 10.4 fmol/mg de proteína en el grupo de +125 d. El cortisol fetal no mostró un perfil particular y osciló en un intervalo de 35-82 nmol/l en todos los grupos (Figura 2).

El perfil de los esteroides sexuales en el suero materno se presenta en la Figura 3. La concentración de progesterona en el suero decreció gradualmente de 46.1 ± 3.7 nmol/l en el grupo de 40–50 d a 11.7 ± 3.4 nmol/l en el de +125 d. Los perfiles de 17α-hidroxiprogesterona y 17β-estradiol en el suero no cambiaron significativamente en los grupos estudiados y fluctuaron en los intervalos de 0.79 ± 0.13 a 1.1 ± 0.14 y de 0.64 ±0.20 a 0.81 ±0.17 nmol/l, respectivamente. Los niveles de 17β-estradiol fueron al-

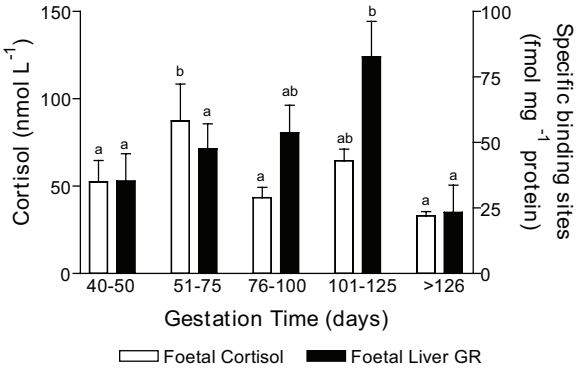

Figura 2. Cortisol fetal y receptores a glucocorticoides hepáticos (GRh). Los valores de cortisol fetal son bajos en todos los periodos. Los GRh fetales aumentan desde el grupo de gestación temprana hasta el grupo de 101-125 días y disminuyen significativamente en el último periodo. Las barras con distinta literal difieren por DMS (P ≤ 0.05).

Figure 2. Fetal cortisol and hepatic glucocorticoid receptors (GRh). Fetal cortisol values are low throughout all periods. Fetal GRh increase from early gestation group to that of 101-125 days and decrease significantly in the last period. Bars with different letters differ by LSD (P ≤0.05).

Discussion

Since the classic work of Van Rensburg,[3] it has been recognized that goats are prone to abortion. In a previous work, an association between elevated concentrations of cortisol in maternal blood and abortion in goats within 102-134 days of gestation was reported.[7] Current work shows that stressed pregnant goats within 101 to 125 days of gestation have higher concentrations of maternal serum cortisol and GRp, when compared to similar stressed goats in other periods of gestation. Flint and Burton[15] measured GRp in ewes and found an increase in the receptor binding sites within 90 to 129 days of gestation, similar to the period in which the higher values were found in this work. An association of elevated GRp and cortisol during labor has also been found in ewes[29]. It appears that the temporal coincidence of the high increase in maternal cortisol levels detected when the GRp are higher, makes the placenta more receptive to this hormone and may participate in the initiation of premature labor in the goats.

It was also found that the competitive binding of progesterone to GRp decreased progressively up to the lowest values in the group of 101-125 d (Figure 4). Further, in the *in vitro* experiments for the binding competition, progesterone is 240 fold more concentrated than the ^{3}H-dexamethasone. However, in the 101-125 d of gestation, the serum cortisol was 36 fold higher than the progesterone. It appears that based on

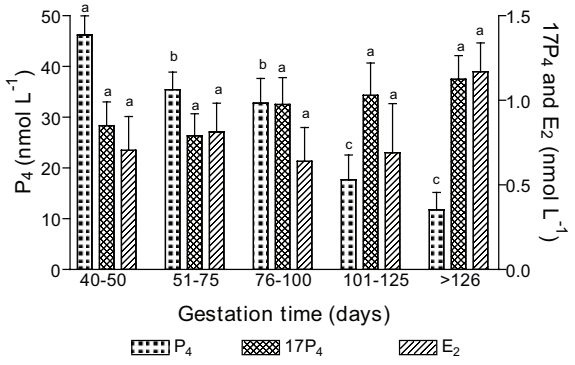

Figura 3. Niveles de esteroides sexuales durante la gestación. Los niveles de progesterona (P_4) caen progresivamente desde el inicio al último periodo de la gestación. Los niveles de 17α-hidroxiprogesterona ($17P_4$) y de 17β-estradiol (E2) no muestran diferencias significativas a lo largo del tiempo, pero tienden a incrementarse en el último periodo de la gestación. Las barras con distinta literal difieren por DMS ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Sexual steroids levels during gestation. Progesterone (P_4) levels drop progressively from the start to the end of gestation. 17α-hydroxyprogesterone ($17P_4$) and estradiol-17β (E_2) levels show no significant differences with time, but tend to increase in the last period of gestation. Bars with different letters differ by LSD ($P \leq 0.05$).

tos (1.17± 0.17 nmol/l) sólo en las cabras de final de gestación (Figura 3). El porcentaje de inhibición de la unión de ^{3}H-dexametasona por la adición de progesterona en los sitios de los GRp decreció progresivamente de 77.6% en el grupo de 40-50 d a 42.8% en el grupo de 101-125 d (Figura 4).

Discusión

Desde el trabajo clásico de Van Rensburg,[3] se ha reconocido que las cabras son una especie propensa al aborto. En un trabajo anterior se identificó una asociación entre concentraciones elevadas de cortisol en la sangre materna y aborto en cabras con 102 a 134 días de gestación.[7] En el presente trabajo se informa que las cabras gestantes estresadas cuando se encuentran entre 101-125 d presentan los valores más altos de cortisol y GRp, comparadas con cabras igualmente estresadas en otros periodos de gestación. Flint y Burton[15] midieron los GRp en la oveja y encontraron un incremento en los sitios de unión entre los 90 y 129 días de gestación, intervalo que comprende el periodo con los valores más altos observados en el presente trabajo. También se ha descrito una asociación entre los

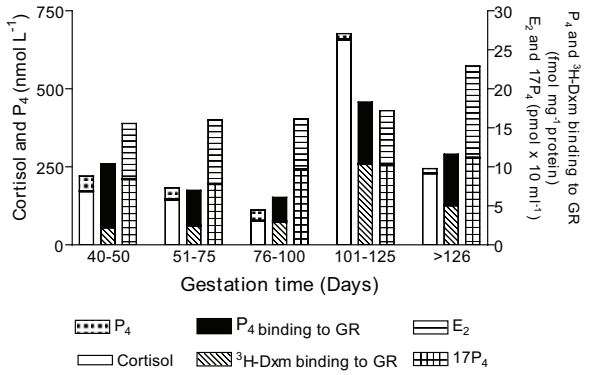

Figura 4. Cambios temporales en las relaciones de las hormonas esteroides y entre ^{3}H-P_4/^{3}H-Dex en los receptores a glucocorticoides en placenta (GRp). La concentración de cortisol-progesterona en el suero es aproximadamente diez veces mayor en el grupo de 101-125 días de gestación cuando se compara con los otros grupos. Los GRp totales son la suma de la unión de ^{3}H-P_4 y ^{3}H-Dxm. La relación de ^{3}H-P_4/ ^{3}H-Dex disminuye en el grupo de 101-125 días. La suma de valores de 17α-hidroxiprogesterona y 17β-estradiol en el suero permanece constante desde el grupo inicial hasta el de 76-100 días de gestación y aumenta a partir del grupo de 101-125 días.

Figure 4. Temporal changes of steroid hormones ratio and the P_4/^{3}H-Dex ratio in the placental glucocorticoid receptors (GRp). The serum concentration of cortisol/progesterone ratio is approximately ten times greater in the 101-125 days group when compared to other gestation groups. Total GRp is the sum of P_4 and ^{3}H-Dxm binding. The relation mass GRp-P_4/GRp-^{3}H-Dex decrease in the 101-125 days group. The sum of 17α-hydroxyprogesterone and estradiol-17β serum levels remains constant from initial group to the 76-100 days group and starts to increase in the 101-125 days group.

these data it can be inferred that competence of progesterone for the receptor is negligible. The binding of progesterone to GRp has been proposed as a possible mechanism by which this hormone protects the fetus from premature activation of the partum process, caused by transient increases in the maternal serum cortisol.[15] Apparently, this protective mechanism is diminished on days 101 to 125, particularly under conditions that increase cortisol such as an intense stress.

Fetal cortisol concentrations in this study were found within normal levels (40–80 nmol/l) and are similar to those reported by Ford *et al.*[30] in fetal goats. Such values had not a particular pattern in all studied groups (Figure 2). Furthermore, these values did not correlate with the increasing number of fetal GRh and did not with the mother's blood cortisol concentrations neither, which suggests that the fetus did not suffer stress during the transportation and maternal fasting conditions. The low levels of fetal cortisol in all studied groups support the hypothesis that maternal cortisol, which increases greatly under stress, may be the main factor that triggers the abortion process in goats, as suggested in a previous study.[7]

The GRh values in the fetus show an inverse pattern when related to maternal GRh: fetal GRh increased progressively from day 40-50 to their maximal values on days 101-125 (Figure 2), when maternal GRh values were at the lowest (Figure 1). The greater values of fetal GRh on days 101-125 may be related with the increasing needs of glucosa by the fetus in the last third of gestation,[31] due to increased glucogenolysis and gluconeogenesis[32] associated with the increment of the glucosa-6-phosphatase activity[33,34] induced by the action of cortisol in this period.[35,36]

It is difficult to explain the great differences between the GRp and the maternal GRh in the 101-125 d group, in spite that both values decreased in the groups with the advancement of gestation (40 to 100 days), the GRp increased abruptly in the 101-125 d group coinciding with the lowest values in maternal GRh. It seems that this period is critical for the gestation under stress when the cortisol levels increases considerably (Figure 1) and the liver is limited in its response for glycogenolysis and glyconeogenesis. This limited response of the maternal liver to cortisol coincides when the placenta is more receptive to such hormone making it prone to start the abortion process.

Sex steroid levels in the maternal serum had the well known profile of gestation: 17α-hydroxyprogesterone and estradiol-17β tended to increase in the groups with more advanced gestation. Progesterone decreased significantly from 40-50 d to the end of gestation (Figure 3).

When analyzed hormonal concentrations and GRp values together over the course of gestation (Figure 4),

GRp y el cortisol elevado durante el trabajo de parto en ovinos.[29] Parece probable que la coincidencia temporal del incremento en los niveles de cortisol materno detectado cuando el alto número de GRp hace a la placenta más receptiva a esta hormona, pueda participar en la iniciación de un trabajo de parto prematuro en las cabras.

Asimismo, se observó que la unión competitiva de progesterona a los GRp disminuyó progresivamente hasta alcanzar los valores más bajos en el grupo de 101-125 d (Figura 4). En los experimentos *in vitro* para calcular el desplazamiento por la progesterona, esta hormona se encuentra 240 veces más concentrada que la ^{3}H-dexametasona. Sin embargo, en el grupo de 101-125 d, el cortisol se encontró 36 veces más alto que la progesterona, de donde se infiere que en este caso, la competencia de la progesterona por el receptor es prácticamente despreciable. La unión de progesterona a los GRp ha sido propuesta como un posible mecanismo por el que esta hormona protege al feto de una activación prematura del proceso de parto, causada por incrementos transitorios en el cortisol materno.[15] Aparentemente, este mecanismo protector está disminuido en los días 101 a 125, particularmente bajo condiciones que incrementan el cortisol como el estrés intenso.

Las concentraciones de cortisol fetal se encontraron, en todos los periodos, dentro de límites normales (40-80 nmol/l) y fueron similares a las informadas por Ford *et al.*[30] en fetos caprinos. Estos valores no tuvieron un patrón particular entre los grupos estudiados (Figura 2). No se correlacionaron con el incremento en el número de GRh fetales ni con el incremento en la concentración de cortisol en la sangre materna, lo cual sugiere que el feto no sufre estrés durante el transporte y las condiciones de ayuno materno. Los bajos niveles de cortisol fetal encontrados en todos los periodos estudiados, reafirman que el cortisol materno es el principal desencadenante del proceso de aborto cuando aumenta extraordinariamente bajo estrés, como se plantea en un estudio anterior.[7]

Los valores de GRh fetales tuvieron un patrón inverso a los del hígado materno: los GRh fetales aumentaron progresivamente de los días 40-50 a sus valores máximos en los días 101-125 (Figura 2), mientras que el número de GRh maternos disminuyeron progresivamente a los valores más bajos en el mismo periodo (Figura 1). El mayor número de GRh fetales entre los días 101 a 125 de gestación pueden estar relacionados con una mayor necesidad de glucosa en el último tercio de la gestación,[31] la consecuente producción de glucosa en el hígado fetal a partir de glucogenólisis y gluconeogénesis,[32] asociada con un incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa[33,34] inducido por el cortisol en ese periodo.[35,36]

it was observed that in the 101-125 d group, the progesterone/cortisol ratio is very low and the binding of progesterone to GRp were found decreased when compared to the previous period reducing thus the progestational effects when the GRp and cortisol are present at very high levels. The above mentioned conditions could result in a greater propensity to abortion in the goat in the early part of the last third of gestation (101-125 days), as has been observed by other researchers in uncontrolled conditions.[37,38]

Although the design of this experiment did not allow to further search the course of abortion in goats and gestation was interrupted, it is important to remark that levels of maternal cortisol in the 101-125 d group were several times more elevated for normal labor [26,39] or abortion[7] in goats as hitherto described.

It is also of interest to note that abortion in goats could had been generated as a protecting adaptive mechanism in this species when adverse extreme factors become a very serious life-threatening, risk for both mother and fetus, thus allowing the mother to survive and have the opportunity to become pregnant again. The results of this study are in good agreement with such hypothesis.

Acknowledgements

Special thanks to M. Sc. Arturo Trejo Gonzalez for the help in obtaining the animals used in this study and for comments.

References

1. MENARD JL, LE MENS P. Listeria Lutter contre cette bacteria dans le lait. Reussir La Chevre 1993; 195: 38-40.
2. MELLADO M, PASTOR FJ. Aborto no infeccioso en caprinos. Ciênc Anim Bras 2006; 7: 167-175.
3. VAN RENSBURG SJ. Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting Angora goats. Onderstepoort J Vet Res 1971; 38: 1-62.
4. WENTZEL D, MORGENTHAL JC, VAN NIEKERK CH. The habitually aborting Angora doe. IV. Adrenal function in normal and aborted does. Agroanimalia 1975; 7: 27-34.
5. WENTZEL D, VILJOEN KS. The habitually aborting Angora doe. VI. Induction of abortion by administration of exogenous oestrogens. Agroanimalia 1974; 7: 41-44.
6. WENTZEL D, ROELOFSE CS. The habitually aborting Angora doe. VII. Induction of abortion by administration of cortisone acetate. Agroanimalia 1975; 7: 45-48.
7. ROMERO-RCM, LOPEZ G, LUNA-MM. Abortion in goats associated with increased maternal cortisol. Small Rumin Res 1998; 30: 7-12.

Es difícil explicar la gran diferencia encontrada en el contenido de GRp y GRh maternos en el grupo de 101-125 d, pese a que ambos valores disminuyeron progresivamente desde los encontrados en el grupo de 40-50 d de gestación hasta los del grupo 76-100 d, los GRp se elevaron abruptamente y coincidieron con los GRh más bajos en el grupo de 101-125 d. Parece que este periodo es crítico para la gestación en una situación de estrés, cuando la concentración de cortisol se eleva considerablemente (Figura 1) y el hígado puede estar restringido en su respuesta a la glucogenólisis y gluconeogénesis. Esta limitante del hígado para responder al cortisol coincide con el momento en que la placenta es más receptiva a esta hormona, predisponiendo así al aborto.

Los niveles de esteroides sexuales encontrados en el suero materno fueron acordes al perfil de gestación conocido: la 17α-hidroxiprogesterona y el estradiol tendieron a incrementarse en los grupos de gestación más avanzada. La progesterona decreció conforme avanzo la gestación.

Cuando se analizaron en conjunto las concentraciones hormonales y los de GRp sobre el curso de la gestación (Figura 4), se observó que en el grupo de 101-125 d, la relación entre la progesterona y el cortisol es muy baja y el porcentaje de la unión de la progesterona a los GRp está disminuido cuando se compara con el de los grupos de periodos previos. El efecto progestacional puede estar reducido cuando los GRp y el cortisol se encuentran muy elevados. Las condiciones señaladas pueden resultar en una predisposición al aborto en la etapa temprana del último tercio de la gestación en las cabras (101-125 días), como ha sido observado en condiciones no controladas por otros investigadores.[37,38]

A pesar de que las condiciones de muestreo no fueron diseñadas específicamente para estudiar el momento del aborto, los hallazgos obtenidos en este trabajo permitieron observar niveles elevados de cortisol materno en el grupo del último tercio de la gestación (101-125 d), incluso mayores a los previamente informados en ovejas[39] y cabras,[7,26] que pueden inducir el parto o bien el aborto.

Es importante hacer notar que el aborto en las cabras pudo haberse generado como un mecanismo adaptativo protector de la especie cuando factores adversos extremos amenazan gravemente la vida y ponen en riesgo tanto a la madre como al feto. En estas condiciones, la madre sobrevive y tiene la oportunidad de gestar nuevamente. Los resultados de este estudio fortalecen dicha hipótesis.

8. CURRIE WB, THORBURN GD. Parturition in goats: Studies on the interactions between the foetus, placenta, prostaglandin F and Progesterone before parturition, at term or at parturition induced prematurely by corticotrophin infusion of the foetus. J Endocrinol 1977; 73: 263-278.
9. FYLLING P. Premature parturition following dexamethasone administration to pregnant ewes. Acta Endocrinol 1971; 66: 289-295.
10. LIGGINS GC, FAIRCLOUGH RJ, GRIEVES SA, KENDALL JZ, KNOX BS. The mechanism of initiation of parturition in the ewe. Recent Prog Horm Res 1973; 290: 111-159.
11. MALTER JP, LEGRAND C, BREULLIER M. La parturition. Dans: THIBAULT C, LEVASSEUR MC, éditeurs. La Reproduction chez les mammiferes et l'homme. INRA-ellipses, Paris 1991: 465-486.
12. FLINT APF, KINGSTON EJ, ROBINSON JS, THORBURN GD. Initiation of parturition in the goat: evidence for control by foetal glucocorticoids through activation of placental C21-steroid 17-α-hydroxilase. J Endocrinol 1978; 78: 367-378.
13. FRANCE JT, MAGNESS RR, MURRY BA, ROSENFELD CR, MASON JI. The regulation of ovine placental steroid 17-α-hydroxylase and aromatase by glucocorticoid. Mol Endocrinol 1988; 2: 193-199.
14. SCHAAF MJM, CIDLOWSKI JA. Molecular mechanism of glucocorticoid action and resistence. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 83: 37-48.
15. FLINT APF, BURTON RD. Properties and ontogeny of the glucocorticoid receptor in the placenta and fetal lung of the sheep. J Endocrinol 1984; 103: 31-42.
16. BOOS A, KOHTES J, STELJES A, ZERBE H, THOLE HH. Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomas during pregnancy, induced parturition and after birth with or without retention of foetal membranes. J Reprod Fertil 2000; 120: 351-360.
17. BOOS A, KOHTES J, JANSSEN V, MÜLLING C, STELLJES A, ZERBE H *et al.* Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. Anim Reprod Sci 2006; 91: 55-76.
18. SCHÄUBLI M, RITTER N, HÄSSIG M, ZERBE H, BLEUL U, BOOS A. Progesterone receptors, oestrogen receptor and glucocorticoid receptors in the bovine intercaruncular uterine wall around parturition. Anim Reprod Sci 2008; 103: 215-227.
19. WHITTLE WL, HOLLOWAY AC, LYE S, CHALLIS JR, GIBB W. The pattern of glucocorticoids and estrogen receptors may explain differences in steroid dependency of intrauterine prostaglandin production at parturition in sheep. J Soc Gynecol Investig 2006; 13: 506-511.
20. DUVAUX-PONTER C, ROUSSEL S, TESSIER J, SAUVANT D, FICHEUX C, BOISSY A. Physiological effects of repeated transport in pregnant goats and their offspring. Anim Res 2003; 52: 553-566.

Agradecimientos

Se agradece al M. en C. Arturo Trejo González la ayuda proporcionada para la obtención de los animales utilizados en este estudio, así como sus comentarios sobre el experimento.

21. KANNAN G, KOUAKOU B, TERRILL TH, GELAYE S. Endocrine blood metabolite and meat quality changes in goats as influenced by short-term, preslaughter stress. J Anim Sci 2003; 81: 1499-1507.
22. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-033-200-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación 16-julio-1996.
23. SIVACHELVAN MN, GHALI M, CHIBUZO GA. Foetal age stimation in sheep and goats. Small Rumin Res 1996; 19: 69-75.
24. PANARELLI M, HOLLOWAY CHD, BAR ABP, FRASER R, KENYLON CHJ. Differences in temperature-sensitive receptor binding in glucocorticoids in spontaneusly hypertensive and normotensive Wistar Kyoto rats. Steroids 1995; 60: 73-75.
25. COPELAND RA. Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols. New York: Chapman and Hall, 1994.
26. LUNA-MM, ROMERO-RCM, VALVERDE-RC. Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. Vet Méx 1990; 21: 115-122.
27. HERRERA DMR, LUNA-MM, ROMERO-RCM. Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. Vet Méx 1993; 24: 223-230.
28. HINTZE JL. NCSS 2000. Number cruncher statistical system for windows. NCSS, Kaysville UT, 2000.
29. GUPTA S, GYOMOREY S, LYE SJ, GIBB W, CHALLIS JR. Effect of labor on glucocorticoid receptor (GR (Total), GRalpha, and GRbeta) proteins in ovine intrauterine tissues. J Soc Gynecol Investig 2003; 10: 136-144.
30. FORD MM, YOUNG IR, CADDY DJ, THORBURN D. Fetal and maternal endocrine changes approaching parturition in the goat: Lack of evidence for prostaglandins E2 and F2α as signals for luteolysis. Biol Reprod 1998; 58: 1065-1070.
31. BAUMAN DE, CURRIE B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci 1980; 63: 1514-1529.
32. BOYD RDH, MORRIS JRFH, MESCHIA G, MAKOWSKI EL, BATTAGLIA FC. Growth of glucose and oxygen uptakes by foetuses of fed and starved ewes. Am J Physiol 1973; 225: 897-902.
33. STEVENSON RE, MORRISS FH, ADCOCK JREW III, HOWELL RR. Development of gluconeogenic

enzymes in fetal sheep liver and kidney. Dev Biol 1976; 52: 167-172.
34. DHANOTIYA RS, BHARDWAJ R. Sequential development of enzymes of gluconeogenesis and glucose synthesis in fetal goat liver. Biomed Biochem Acta 1988; 47: 805-808.
35. FOWDEN AL, COULSON RL, SILVER M. Endocrine regulation of tissue glucose-6 phosphatase activity in the fetal sheep during late gestation. Endocrinology 1990; 126: 2823-2830.
36. FRANCO KL, GIUSSANI DA, FORHEAD AJ, FOWDEN AL. Effects of dexamethasone on the glucogenic capacity of fetal, pregnant, and non-pregnant adult sheep. J Endocrinol 2007; 192: 67-73.
37. MELLADO M. La cabra criolla en América Latina. Vet Méx 1997; 28: 333-343.
38. ENGELAND IV, WALDELAND H, ANDRESEN Ø, LØKEN T, BJÖRKMAN C, BJERKÅS I. Foetal loss in dairy goats: An epidemiological study in 22 herds. Small Rumin Res 1998; 30: 37-48.
39. KHAN JR, LUDRI RS. Hormone profile of crossbred goats during the periparturient period. Trop Anim Health Prod 2002; 34: 151-162.