



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

*“Repulsión y atracción diferencial hacia distintos fluidos fetales en la oveja (*Ovis aries*)”*



Marcela Alsina Llanes

Orientador: Dra. Daniella Agrati

Co-orientador: Dra. Annabel Ferreira

Tribunal:

Ana Silva

Andrés González

Natalia Uriarte

Annabel Ferreira

Diciembre, 2010

INDICE

RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES.....	4
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVOS	6
General	6
Específicos	7
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Animales	7
Obtención de las muestras a probar	7
Pruebas comportamentales.....	8
Prueba de preferencia con comida.....	8
Prueba de preferencia con bolsas.....	8
Criterio de inclusión.....	9
Protocolo experimental	9
Experimento 1: Validación de la prueba de preferencia de lamido con bolsas	9
Experimento 2: Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA	9
Análisis estadístico.....	10
RESULTADOS.....	10
Experimento 1: Validación de la prueba de preferencia de lamido con bolsas	10
Experimento 2: Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA	12
Pruebas pre-parto	12
Pruebas peri-parto	13
DISCUSIÓN	14
Validación de la prueba de preferencia con bolsas	14
Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA	15
PERSPECTIVAS	19
REFERENCIAS	19

RESUMEN

La supervivencia del cordero requiere del rápido desarrollo de un estrecho vínculo con la madre, el cual se ve facilitado por la presencia de los fluidos fetales (FF) sobre el mismo. Así, los FF que en otros momentos del ciclo reproductivo son repulsivos, se vuelven fuertemente atractivos, manteniendo a la oveja en el lugar del parto y promoviendo los lamidos del cordero. Entre los FF, el líquido amniótico (LA) ha sido implicado en los procesos de repulsión-atracción, sin embargo se desconoce si otros FF participan en dichos procesos. En este sentido, el líquido alantoideo (ALA), que se expulsa durante el nacimiento, podría ser igualmente atractivo que el LA durante el parto y repulsivo antes del mismo. Para probar esta hipótesis evaluamos las respuestas de repulsión y atracción hacia el LA y el ALA exhibidas por ovejas preñadas y parturientas a través de pruebas de preferencia. Los resultados mostraron que mientras el LA cambia su valor afectivo de repulsivo a atractivo al parto, el ALA resulta neutro durante el pre-parto y atractivo para las ovejas durante la expulsión fetal. Estos resultados indican que el LA y el ALA presentan diferente valor afectivo para las ovejas y sugieren que la atracción hacia los FF durante el peri-parto es un fenómeno más generalizado que la repulsión hacia los mismos fuera de este período. Este trabajo constituye una primera instancia en la caracterización de compuestos con significado biológico, cuyo valor afectivo cambia durante el ciclo reproductivo.

ANTECEDENTES

El rápido desarrollo del comportamiento maternal durante el peri-parto en la oveja, al igual que en la mayoría de los mamíferos, es esencial para la supervivencia y el correcto desarrollo de las crías (Poindron, 2001). Además, en especies sociales con crías precoces (que nacen con importante grado de desarrollo y autonomía sensorial y motora), como es el caso de la oveja (*ovis aries*), la formación rápida de un vínculo madre-cría selectivo es una característica frecuente (Lévy & Keller, 2009; Poindron, 2001; Poindron, et al., 1988). Así, se ha propuesto que en la oveja parturienta ocurren dos procesos distinguibles: el desarrollo de una sensibilidad hacia estímulos del cordero que le permite desplegar comportamiento maternal en presencia de cualquier neonato, *sensibilidad maternal* (Levy et al., 1991; Poindron et al., 1984; 2007), y el establecimiento de un vínculo exclusivo con un cordero, *selectividad maternal*, que se manifiesta a través de cuidados dirigidos solamente hacia ese individuo y el rechazo de otros corderos (Poindron et al., 1984; 2007).

Poco antes del parto, las ovejas no sólo muestran una conducta materna completa si hay corderos recién nacidos presentes, sino que exhiben un cambio radical en la percepción afectiva de los fluidos fetales (FF) que cubren al cordero. Estas sustancias son fuertemente repulsivas para ovejas no parturientas y se vuelven altamente atractivas y son ávidamente consumidas durante el peri-parto (Poindron, 2001; Poindron, et al., 1988). Los FF que cubren al cordero despiertan gran atracción en las madres, manteniendo a las ovejas en el lugar del parto y estimulando los lamidos, así como otros cuidados maternos dirigidos hacia la cría (Lévy et al., 1983; Poindron et al., 1980). En este sentido, las ovejas multíparas son capaces de aceptar corderos ajenos de 24 horas de nacidos cuando éstos están cubiertos por FF (Levy & Poindron, 1984), mientras que la remoción de los FF del cuero de los corderos impide el establecimiento del contacto madre-cría en ovejas primíparas (Levy & Poindron, 1987). Esta evidencia ha llevado a considerar a los FF potentes organizadores del comportamiento, ya que facilitan el desarrollo normal del vínculo materno-filial (Levy & Poindron, 1987).

El fenómeno repulsión-atracción hacia los FF depende principalmente de estímulos olfativos brindados por éstos, ya que ovejas anósmicas son incapaces de mostrar repulsión o atracción hacia los FF (Lévy et al., 1983; 1995). De igual forma, el olfato es la modalidad sensorial primordial para el reconocimiento del cordero y fundamental para el establecimiento del comportamiento maternal, debido a que ovejas anósmicas muestran menor tiempo de lamido

y latencia de aceptación a la ubre de su propio cordero, además de una pérdida de la selectividad (Levy et al., 1983; 1995; Levy & Poindron, 1987). Este fenómeno de reconocimiento olfativo y formación de un vínculo selectivo aparece en otras especies domésticas de ungulados como cabra, vacas, yeguas y cerdas (Lévy & Keller, 2009; Poindron et al., 2007; Romeyer et al., 1994).

El aumento de la liberación de estrógenos placentarios que ocurre al final de la gestación, conjuntamente con la estimulación vagino-cervical (EVC) generada durante el proceso del parto, desencadena el inicio del período sensible, durante el cual se desarrollan las respuestas maternas, así como la atracción hacia los FF (Lévy et al., 1983; Poindron & Lévy, 1990; Poindron et al., 1980). La EVC induce la liberación de oxitocina, que actuando en áreas del sistema nervioso central relacionadas al control del comportamiento maternal, como el área preóptica media, el núcleo paraventricular del hipotálamo y los núcleos de la estría terminal, promueve una respuesta óptima a los estímulos del neonato (Lévy et al., 1996; Poindron et al., 2007). A su vez, se ha propuesto que la oxitocina actuando en estas mismas áreas promueve cambios en el valor afectivo de repulsivo a atractivo de los FF (Lévy et al., 1983). En este sentido, la identificación de los compuestos repulsivos-atractivos de los FF, así como de aquellos que contienen el olor individual del cordero, constituye una primera instancia en la caracterización de los mecanismos biológicos implicados en el cambio de valor afectivo de estímulos con significado biológico, así como los procesos de consolidación del reconocimiento individual de un co-específico (Keller et al., 2005).

La mayoría de los estudios que abordan la repulsión-atracción hacia los FF que se expulsan durante el parto, se han centrado en el estudio del líquido amniótico (LA) (Levy et al., 1983; Lévy & Poindron, 1987), sin embargo otras sustancias componen estos FF. Así, durante el proceso del parto se expulsan dos vesículas extra-embrionarias: el saco alantoideo conteniendo el líquido alantoideo (ALA) y el saco amniótico conteniendo el LA (Jonson, 2007). Curiosamente, las ovejas parturientas, lamen el lugar donde fue derramado el ALA, lo que sugiere que el mismo también es atractivo.

El saco alantoideo es una vejiga urinaria primitiva del embrión que recibe orina del feto durante toda la gestación (Jonson, 2007). Sugestivamente el LA, al igual que el ALA, se encuentra contaminado con la orina del feto, siendo la orina fetal dentro del amnios y alantoides aproximadamente igual en volumen durante el último trimestre de gestación

(Jonson, 2007; Wintour et al., 1994), aunque con diferencias en su composición (Ross et al., 1988). Sobre la base de las características fisiológicas similares de ambos FF es posible que el LA y el ALA sean igualmente atractivos para las ovejas durante el parto. Si el mismo compuesto que es repulsivo en otros momentos del ciclo se torna atractivo durante el peri-parto, podríamos inferir que el ALA no sólo es atractivo en el peri-parto sino que también repulsivo fuera del mismo.

Para evaluar las respuestas de repulsión o indiferencia hacia los FF exhibidas por ovejas durante el pre-parto, empleamos, al igual que Levy y colaboradores (1983), pruebas de preferencia por alimento contaminado con FF o con fluido control, con el fin de utilizar la comida como incentivo. Sin embargo, durante el peri-parto, no es necesario aumentar el interés de las ovejas por los FF, ya que son atractivos *per se*. Más aún, usar el comportamiento alimenticio para atracción a los FF puede enmascarar resultados, debido a que este comportamiento estaría influenciado por la motivación alimenticia. Por este motivo, diseñamos un nuevo modelo de preferencia con dos bolsas, una mojada con FF y otra con líquido control, que permite determinar la atracción o indiferencia hacia FF a través del lamido, un comportamiento característico del peri-parto, que confiere al modelo validez etológica.

HIPÓTESIS

El ALA es atractivo para ovejas parturientas y repulsivo para las no parturientas, al igual que el LA.

OBJETIVOS

General

Comparar la repulsión y la atracción hacia el LA y el ALA de ovejas gestantes y parturientas, a través de pruebas de preferencia.

Específicos

- Validar la prueba de preferencia de lamido con bolsas para determinar atracción hacia los FF durante el peri-parto.
- Establecer si el LA y el ALA son repulsivos durante el pre-parto mediante pruebas de elección por comida contaminada con FF o con control
- Determinar si el LA y el ALA son atractivos durante la expulsión fetal mediante pruebas de elección por bolsas mojadas con FF o control

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ovejas (*Ovis aries*) de la raza Ideal pertenecientes al establecimiento “La Estanzuela” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50, Km 11, Colonia. Las ovejas fueron identificadas mediante numeración pintada en el vellón. Se sincronizaron los celos con esponjas de progesterona y se realizó la monta natural con carneros seleccionados y marcados, registrándose la fecha de la misma. La encarnerada se efectuó en lotes escalonados de manera de obtener partos durante un período extenso y asistir a la mayor cantidad posible.

Al final de la gestación, las ovejas se alojaron en bretes individuales de 2,0 x 2,0 m y se alimentaron con ración y agua *ad libitum*, con el fin de habituarlas a las condiciones de realización de los protocolos experimentales. Los partos se indujeron mediante la administración de 16,0 mg/ animal i.m. de dexametasona (Disperdex, Lab. Disper) en el día 144 de gestación, procedimiento que no afecta al comportamiento maternal (Poindron & Le Neindre, 1980).

Obtención de los FF

En los primeros partos (n=10) se colectaron los FF a ser utilizados en las pruebas de preferencia: LA y ALA.

Las ovejas peri-parturientas fueron identificadas a partir de manifestaciones conductuales

características de este período (agitación, incremento en la locomoción y emisión de vocalizaciones de alta intensidad, Poindron, 2001). Se colectó el ALA (líquido de coloración marrón y baja viscosidad) a través de la punción de la vesícula alantoidea, generalmente primera en ser expulsada (Jainudeen et al., 2002) y posteriormente se colectó el LA (líquido de coloración amarillenta y alta viscosidad). Los recipientes conteniendo ambos FF fueron rotulados y almacenados a -20° C hasta el momento de su utilización.

Pruebas comportamentales

Prueba de preferencia con comida (adaptada de Levy et al., 1983)

Consistió en colocar en el brete de la oveja dos recipientes separados 10,0 cm uno del otro, conteniendo 40,0 g de ración (en pellets) mojada con un volumen de 20,0 ml del FF a ensayar (LA o ALA) o carboximetilcelulosa disuelta en agua (control) a una temperatura aproximada de 37°.

La prueba comienza cuando la oveja olfatea la comida y tiene una duración de 3 min durante la cual se registra el tiempo de ingesta, así como la latencia de olfateo e ingesta de cada comida. Finalizada la prueba se pesa la comida sobrante de cada recipiente (masa rechazada) para calcular la cantidad de comida ingerida.

Empleamos carboximetilcelulosa (CMC) disuelta en agua como sustancia control, ya que esta disolución posee una viscosidad intermedia entre el LA y ALA y en pruebas preliminares determinamos que no es repulsiva ni atractiva para ovejas no-parturientas o parturientas.

Prueba de preferencia con bolsas

Basados en que la atracción a los FF en las ovejas parturientas se refleja principalmente en el comportamiento de lamido, diseñamos una prueba donde el interés de la oveja por el FF se manifiesta en el lamido de bolsas de agua caliente forradas con tela corderito. Este modelo evita mezclar dos estímulos atractivos, como la comida y los FF, y tiene validez etológica, ya que evalúa el comportamiento de lamido.

La prueba consistió en colocar dos bolsas de agua caliente forradas con tela corderito separadas 10,0 cm, mojadas con un volumen de 10,0 ml del FF (LA o ALA) o carboximetilcelulosa disuelta en agua (control). La prueba comienza cuando la oveja olfatea o

lame una de las bolsas y tiene una duración de 3 min, durante el cual se registra el tiempo de lamido, así como la latencia de lamido y olfato de cada una.

La latencia consiste en el tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y el inicio del parámetro comportamental analizado.

Criterio de inclusión

En las pruebas con comida fueron incluidas las ovejas que comieron más que el 5% de la comida total ofrecida y por más de 5 segundos, mientras que en el modelo de bolsa se incluyeron los animales que por lo menos olfatearon una de las bolsas.

Protocolo experimental

Experimento 1: Validación de la prueba de preferencia de lamido con bolsas

Para validar esta prueba como ensayo de atractividad de las ovejas parturientas hacia los FF, se compararon la preferencia por LA vs. CMC en prueba de preferencia con alimento (n=13), en la cual se estableció previamente que prefieren el LA (Lévy et al., 1983), y en prueba de preferencia con bolsas (n=10). Las pruebas se realizaron de forma contrabalanceada, para evitar posibles efectos de la experiencia previa.

Experimento 2: Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA

Para comparar la repulsión y la atracción de los FF LA y ALA, se trabajó con un grupo de ovejas (n=11) que fueron sometidas a pruebas de preferencia con alimento pre-parto y con bolsas durante el peri-parto de la siguiente manera:

1. *pruebas pre-parto*: a los 145 días de gestación, las ovejas fueron habituadas por 2 hs a un brete sin alimento. Posteriormente se realizó la prueba de preferencia por alimento con LA vs. CMC y 3 min después ALA vs. CMC. El orden de las pruebas de preferencias fue contrabalanceado dentro del grupo. Luego de la prueba se reintegró el agua y la comida.
2. *prueba al parto*: la prueba comenzó cuando se observaron las patas del cordero en la vagina de la oveja, o inmediatamente luego de la expulsión del mismo. En este caso, el cordero se retiró sin que la madre lo viera, junto con la comida y el agua del brete y se realizó la prueba de preferencia con bolsa con LA vs. CMC y 3 min después ALA vs. CMC. Al igual que en las pruebas pre-parto, el orden de las mismas fue contrabalanceado dentro del grupo.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medianas (rango semi-intercuartil, RSIQ) y fueron analizados mediante pruebas no-paramétricas (Siegel & Castellan, 1988). Las comparaciones de datos dependientes, dentro de cada grupo, fueron realizadas mediante el análisis de varianzas de Friedman, seguido de la prueba pareada de Wilcoxon. El nivel de significancia escogido para las comparaciones estadísticas fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1: Validación de la prueba de preferencia de lamido con bolsas

Todos los animales cumplieron con el criterio de inclusión para la prueba con alimento ($n=13$) y para la prueba con bolsas ($n=10$).

El fuerte interés de las ovejas peri-parturientas por los FF se reflejó, como se muestra en la Tabla 1, en una menor latencia de ingesta de comida tratada con LA ($T=7,0$; $p < 0,05$) y de lamido de bolsas mojadas con LA ($T=3,0$; $p < 0,05$) en comparación con las control. Asimismo, la figura 1 muestra que el tiempo total de ingesta fue significativamente mayor cuando la comida se encontraba tratada con LA que con control ($T=8,5$; $p < 0,05$), y del mismo modo, el tiempo total de lamido fue mayor hacia las bolsas mojadas con LA que hacia las mojadas con control ($T=0,0$; $p < 0,01$).

Tabla 1. Latencias de ingesta de alimento y de lamido de bolsas durante el peri-parto.

	Latencia (s)	
	Ingesta	Lamido
LA	0,0 (0,0)*	0,0 (0,0)*
Control	50,0 (90,0)	180,0(22,5)

Los valores se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0.05$ vs control, prueba pareada de Wilcoxon.

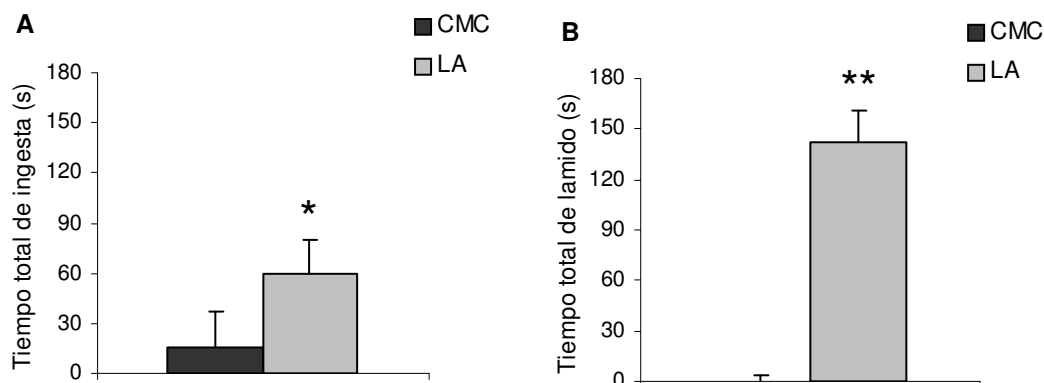


Figura 1. Tiempo total de ingesta de ración mojada con LA o con Carboximetilcelulosa (CMC) (n=13, Panel A) y de lamido de bolsas mojadas con LA o con CMC (n=10, Panel B) para ovejas peri-parturientas. Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, vs control, prueba pareada de Wilcoxon.

Al analizar la prueba de ingesta por minuto (Figura 2A) observamos que el tiempo alimentándose de comida tratada con LA respecto a la comida control fue significativamente mayor en el minuto 1 ($T=6,0$; $p < 0,05$) y en el minuto 2 ($T=8,5$; $p=0,05$), pero no en el tercero ($T=12,5$; NS), indicando una pérdida de interés en la prueba. Sin embargo, en la prueba de lamido, el tiempo de lamido de las bolsas mojadas con LA durante los tres minutos fue significativamente mayor al de sus controles (Figura 2B, min 1: $T=1,0$; $p < 0,01$, min 2: $T=0,0$; $p < 0,05$ y min 3: $T=0,0$; $p < 0,01$).

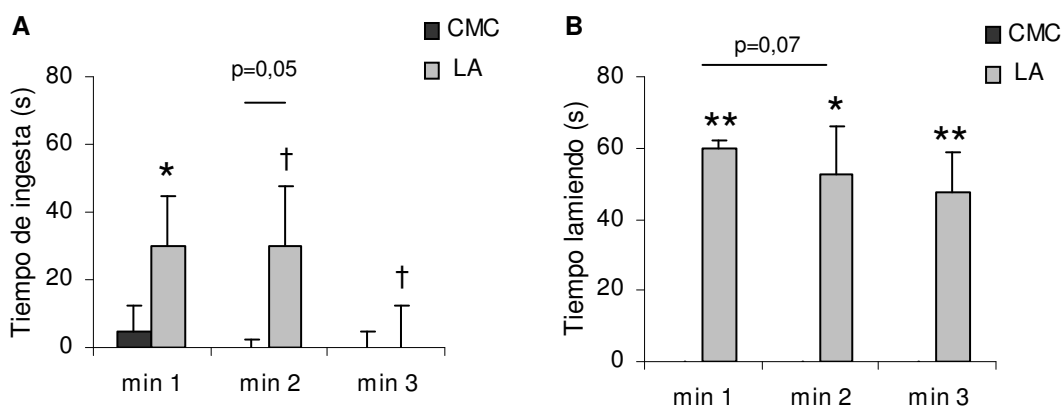


Figura 2. Tiempo de ingesta de ración mojada con LA o con CMC (n=13, Panel A) y de lamido de bolsas mojadas con LA o con CMC (n=10, Panel B) para ovejas peri-parturientas y por minuto. Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs control y † $p < 0,05$ vs LA min 1, prueba pareada de Wilcoxon.

Experimento 2: Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA

Pruebas pre-parto

Según el criterio de inclusión, 8 de 11 animales probados fueron incluidos en el análisis.

La figura 3A muestra que durante este período, el tiempo total de ingesta de comida control fue significativamente mayor respecto al de la tratada con LA ($T=0,0$; $p<0,05$), mientras que no existieron diferencias significativas entre la ingesta de comida con ALA y su control ($T=8,0$; NS). Asimismo, el tiempo de ingesta de ración tratada con ALA fue significativamente mayor respecto al del LA ($T=2,0$; $p<0,05$).

Del mismo modo, el porcentaje de consumo del total ingerido por animal (Figura 3B) fue mayor cuando la comida se encontraba tratada con control que con LA ($T=0,0$; $p<0,05$) y no se hallaron diferencias significativas entre el ALA y su control ($T=14,5$; NS). Igualmente, el porcentaje de comida ingerida fue mayor cuando la comida se encontraba tratada con ALA respecto al LA ($T=4,0$; $p<0,05$).

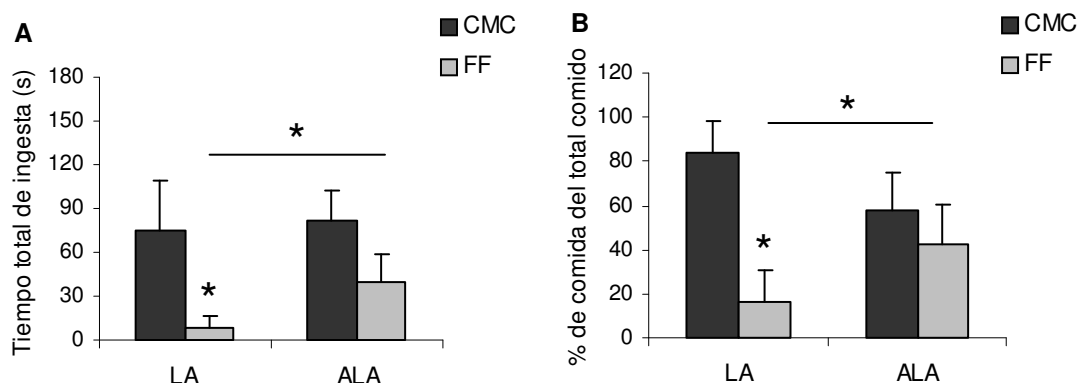


Figura 3. Tiempo total de ingesta de ración mojada con FF (LA o ALA) o con Carbox ($n=8$, Panel A) y porcentaje de ración consumida mojada con FF o con Carbox del total ingerido ($n=8$, Panel B) para ovejas pre-parturientas. Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p<0,05$ vs control, * $p<0,05$ LA vs ALA, prueba pareada de Wilcoxon.

Las latencias de olfateo e ingesta de los FF no mostraron diferencias significativas respecto a sus respectivos controles (Tabla 2 superior, LA: Ingesta, $T=7,0$; NS y Olfateo, $T=6,0$; NS y ALA: Ingesta, $T=10,0$; NS y Olfateo, $T=1,0$; NS), ni entre sí (Tabla 2 superior, Ingesta: $T=15,0$; NS y Olfateo: $T=11,0$; NS).

Pruebas peri-parto

Todos los animales probados cumplieron con el criterio de inclusión para el análisis (n=11).

La figura 4 muestra que el tiempo total de lamido fue mayor para cada uno de los FF respecto a sus controles (LA: T= 0,0; p<0,01 y ALA: T=0,0; p<0,01). A su vez, el tiempo de lamido del LA fue mayor al del ALA (T=11,0; p=0,05).

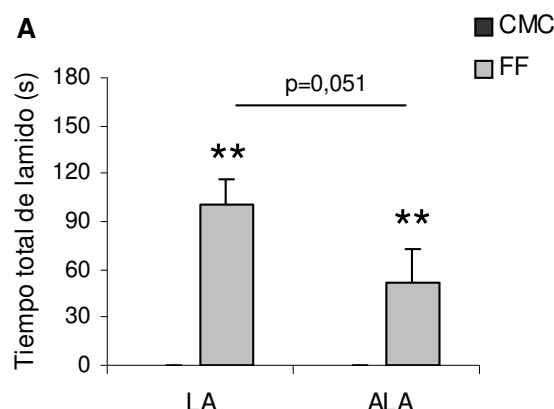


Figura 4. Tiempo total de lamido de bolsas mojadas con FF o con CMC (n=11) durante la prueba en ovejas peri-parturientas (n=11). Los datos se expresan como medianas (RSIQ). **p<0,01 vs control, prueba pareada de Wilcoxon.

El interés de las ovejas por los FF resultó en menores latencias de lamido respecto al control (Tabla 2 inferior, LA: T=0,0; p<0,01 y ALA: T=0,0; p<0,01). Por otra parte, las latencias de lamido y olfateo entre ambos fluidos no difirieron (Tabla 2 inferior, lamido: T=16,0; NS y olfateo: T=16,0; NS).

Tabla 2. Latencias de ingesta y olfateo durante el pre-parto en pruebas de preferencia con comida y durante el peri-parto con bolsas.

		Latencia (s)			
		Control	LA	Control	ALA
pre-parto	Ingesta	7,5 (11,9)	55,0 (41,9)	4,5 (9,3)	61,0 (49,9)
	Olfateo	180,0 (88,1)	10,5 (9,5)	180,0 (89,1)	30,0 (89,5)
peri-parto	Lamido	180,0 (0,0)	4,0 (3,3)**	180,0 (0,0)	3,0 (1,75)**
	Olfateo	20,0 (32,8)	29,0 (87,3)	6,0 (51,0)	180,0 (88,0)

Los valores se expresan como medianas (RSIQ). **p<0,01 vs control, prueba pareada de Wilcoxon.

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra que:

- I. La prueba de preferencia de lamido con bolsas posee validez etológica y permite evaluar grados o intensidades de “atractividad” de fluidos durante el periparto.
- II. El LA fue repulsivo y el ALA neutro para las ovejas pre-parturientas, mientras que ambos fluidos resultaron atractivos durante la expulsión fetal, aunque el LA en mayor grado que el ALA.

Validación de la prueba de preferencia con bolsas

Las hembras parturientas exhibieron preferencia por los FF en ambos modelos, validando el uso de la prueba de preferencia con bolsas como modelo de atractividad durante el peri-parto en la oveja. Sin embargo, estos modelos presentan algunas diferencias. Así, en la prueba de ingesta, las ovejas consumieron la comida tratada con control, mientras que en el modelo de bolsas, únicamente lamieron aquellas tratadas con FF, revelando que el modelo validado, a diferencia del alimentario, no mezcla el interés por dos estímulos reforzadores como son la comida (Douglas et al., 2007) y los FF (Levy et al., 1983; Levy & Poindron, 1984; 1987; Poindron, 2001). A su vez, en la prueba con comida, la ingesta de alimento tratado con LA disminuyó al final de la misma, en contraste a lo observado en la prueba con bolsas, sugiriendo que una disminución de la motivación alimenticia podría enmascarar la atracción por los FF en la primera prueba. En este sentido, con el modelo de ingesta se han obtenido resultados confusos de acuerdo a la situación experimental. Se reportó que ovejas anósmicas en pruebas de preferencia al parto no muestran atracción por la comida tratada con FF ni repulsión previo al parto (Levy et al., 1983; Levy et al., 1995), apoyando el papel del sistema olfativo en los fenómenos de repulsión-atracción hacia los FF. Sin embargo, si bien las ovejas *sham*-operadas exhiben repulsión por los FF durante el pre-parto, no muestran atracción hacia los mismos al parto (Levy et al., 1995). La variación en los resultados de atracción a los FF utilizando pruebas alimenticias, quizás se deba, a su vez, a que la atracción por los FF se manifiesta durante el peri-parto en el lamido de los mismos (Levy et al., 1983), comportamiento que en el modelo de ingesta está ausente. En este sentido, el modelo con bolsas tiene la ventaja de que tanto el estímulo provisto, bolsa de agua tibia forrada en tela con corderito y mojada con FF, como el comportamiento analizado, el lamido, semejan las condiciones y comportamientos observados en el peri-parto. Es interesante resaltar que la

presencia de FF sobre el cordero promueve el lamido por la madre durante el peri-parto, probablemente facilitando la formación del vínculo madre-cría (Levy & Poindron, 1984; Poindron, 2001).

A pesar de las claras ventajas del modelo de preferencia con bolsas sobre el de preferencia alimenticia para determinar atracción durante el peri-parto, éste no permite evaluar la repulsión, ya que las bolsas mojadas con control no son lamidas.

En suma, el modelo propuesto nos permite determinar la atractividad de un compuesto a lo largo del tiempo y de forma independiente de otros estímulos reforzadores, por lo que es adecuado para evaluar grados de atractividad de diferentes sustancias con valor biológico durante el peri-parto en la oveja. Por este motivo, se empleó el modelo de preferencia con bolsa para evaluar la atracción hacia el LA y el ALA en el presente trabajo.

Repulsión y atracción hacia el LA y el ALA

Este trabajo demuestra que en las distintas etapas del ciclo reproductivo, el LA y el ALA presentan diferentes valores afectivos para las ovejas. El reducido tiempo de ingesta de ración tratada con LA concuerda con estudios previos que muestran que el mismo es fuertemente repulsivo durante el pre-parto (Levy et al., 1983; 1995; Levy & Poindron, 1987; Poindron et al., 1988; Poindron, 2001). Sin embargo, el ALA, otro FF expulsado durante el parto y consumido por las ovejas parturientas, no resultó repulsivo durante este período. Estos resultados en conjunto refutan la hipótesis de que el ALA, al igual que el LA, es repulsivo durante el pre-parto, e indican que el carácter repulsivo de los FF está dado principalmente por el LA. Durante el peri-parto, a diferencia del pre-parto, ambos componentes de los FF presentaron características hedónicas similares, siendo atractivos para las madres, si bien el LA resultó más atractivo que el ALA.

La clara repulsión del LA durante el pre-parto, así como la mayor atracción hacia el mismo en el peri-parto respecto al ALA, podrían deberse a las diferencias en la composición - concentraciones y tipos de compuestos- de ambos FF, así como en las propiedades fisicoquímicas de los mismos. Mientras que el ALA proviene de la orina fetal y de secreciones de la membrana alantoidea, el LA también se origina de la orina fetal, pero a su vez contribuyen al mismo la circulación materna y las secreciones de las vías respiratorias y

cavidad bucal del feto (Jainudeen et al., 2002). El flujo de orina fetal a ambos FF varía a lo largo de la gestación, comenzando la orina a fluir al LA a partir del día 80 de gestación en cantidades crecientes (Bacchi Moderna & Fieni, 2004; Jainudeen et al., 2002), mientras que hacia el ALA disminuye desde el día 100 de preñez (Mellor & Slater, 1971; Jainudeen et al., 2002).

Estas diferencias en el origen de ambos FF determinan sus respectivas composiciones. El LA, por ejemplo, presenta un incremento de creatina y urea con la edad gestacional (Wintor et al., 1994; Liu et al., 2008; Ross et al., 1988), mientras que el ALA presenta un aumento de creatina, pero la concentración de urea es variable a lo largo de la preñez (Ross et al., 1988). A pesar de la abundancia de aminoácidos en ambos fluidos, también se han reportado algunas diferencias en relación a los mismos. Así, en el LA los cuatro aminoácidos más abundantes en la gestación tardía son: serina, glicina, alanina y glutamina, mientras que en el ALA la serina y alanina son los más abundantes y presenta otros aminoácidos en concentraciones importantes como la taurina, arginina, citrulina, glicina y glutamina (Kwon et al., 2003). Otra diferencia entre ambos fluidos es que el LA en la oveja y en la cerda contiene varios tipos de proteínas, entre ellas las derivadas del plasma fetal, como globulinas y albúmina, mientras que el ALA carece de esta última (McKenna., 1984; Morris et al., 1980). En este sentido, es interesante destacar que observamos que durante el peri-parto las ovejas lamen ávidamente clara de huevo (Ferreira et al., en preparación), un fluido biológico con alto contenido de ovoalbumina (Huntington & Stein, 2001), proteína similar a la albúmina de mamíferos.

A partir de la determinación de las características bioquímicas de los FF en la gestación tardía en yeguas, Williams y colaboradores (1993), propusieron que el ALA se asemeja más a la orina, en especial por los valores altos de creatinina, gamma glutamil transferasa y fósforo, mientras que la composición del LA es similar a un trasudado de plasma, por los valores altos de sodio y similares de cloruro. En este sentido, sería interesante probar la preferencia por sangre y orina en las distintas etapas reproductivas de la oveja para evaluar si son las semejanzas del LA con la sangre y del ALA con la orina, las que le otorgan sus características hedónicas.

Las diferencias encontradas en el comportamiento de los animales en las pruebas de repulsión-atracción entre los dos FF, podrían deberse, por lo tanto, a las variaciones en las concentraciones y/o al tipo de compuestos presentes en el ALA y el LA. En relación a la

concentración de compuestos, podemos hipotetizar que la baja osmolaridad del ALA, por un aumento del volumen del mismo durante la gestación, en comparación al LA (Mellor & Slater, 1971; Winton et al., 1994) ocasiona un efecto de dilución del componente repulsivo-atractivo presente en ambos fluidos. Esto explicaría la falta de repulsión hacia el ALA durante el pre-parto, y la menor atracción hacia el mismo durante el peri-parto. Por otra parte, puede ser una mezcla de componentes la que provoque el fenómeno de repulsión-atracción. En este sentido, Berre y colaboradores (2008), en experimentos en humanos, muestran que variando las concentraciones de los componentes de un olor específico, el cual es resultado de una mezcla, se modifica la cualidad percibida del olor. Este experimento manifiesta la importancia de las relaciones de concentración que deben mantener los componentes de una solución para ser percibidos como un olor (Berre et al., 2008). Este hecho podría explicar las diferencias en la percepción de ambos FF sobre la base de las variaciones en la concentración de los compuestos mencionadas anteriormente.

Por otra parte, y que las diferencias en repulsión-atracción hacia el LA y el ALA se deban a variaciones en sus componentes. Apoyando a esta hipótesis, mediante el fraccionamiento químico de la mezcla de ambos FF en base a su polaridad, se obtuvo una fracción que conservó la repulsión durante el pre-parto y la atracción en el peri-parto, mientras que las dos fracciones derivadas de ésta no fueron repulsivas en el pre-parto, pero si atractivas en el peri-parto (pasantía Valentina Olivera, 2010). Este resultado indica que los compuestos que resultan repulsivos y atractivos son distintos, y que hay más de un compuesto que se vuelve atractivo durante el parto. Parecería, entonces, que el fenómeno de repulsión sería más concreto hacia ciertos compuestos, siendo la atracción más extendida. Así, a la hora del parto las ovejas no sólo consumen ávidamente los FF sino que son atraídas por otras sustancias con valor biológico, como la sangre y la placenta (Lévy & Keller, 2009), e incluso por algunos compuestos proteicos como la clara de huevo (Ferreira et al., en preparación).

En cuanto a la repulsión hacia los FF, específica del LA, podrían ser las proteínas presentes en el LA y no en el ALA las que sean repulsivas para las ovejas no-maternales. En este sentido, la albúmina, una proteína que se encuentra en la sangre, también está presente en el LA de ovejas (Morris et al., 1980) y cerdos (McKenna, 1984) gestantes, mientras que en el ALA está ausente. Del mismo modo, observamos que durante el pre-parto, la sangre resulta repulsiva para ovejas (Ferreira et al., en preparación), lo que apoyaría la idea de que la repulsión al LA

se debe a proteínas presente en ambos compuestos biológicos. En este sentido, sería interesante explorar si la clara de huevo también resulta repulsiva durante este periodo.

Las áreas asociadas al control del cuidado maternal en la oveja involucran el área preóptica media, el núcleo paraventricular del hipotálamo y los núcleos de la estría terminal (Poindron, 2001). Por otro lado, el proceso por el cual se establece la selectividad incluye áreas asociadas a la formación de memorias olfativas del cordero como la corteza piriforme, la amígdala y las cortezas orbitofrontal y frontal medial (Kadohisa & Wilson, 2006; Keller et al., 2005). En particular, se ha implicado a la amígdala en el procesamiento olfativo de una memoria selectiva de la identidad del cordero, dado que la inactivación reversible de los núcleos cortical y medial de la amígdala previene la memorización del olor individual del mismo, impidiendo la selectividad materna sin interferir con la expresión del comportamiento maternal (Keller et al., 2004, Keller et al., 2005). Sin embargo, aún no se ha identificado el circuito neuronal implicado en el fenómeno de repulsión-atracción hacia los FF, que podría implicar procesos independientes a los asociados a la formación del vínculo materno-filial. El hecho de que este fenómeno dependa principalmente de los estímulos olfativos, sugiere que áreas implicadas en el procesamiento olfativo como la corteza piriforme podrían estar implicadas en el mismo. En este sentido, la corteza piriforme presenta dos subdivisiones, una anterior y una posterior, que se ha reportado en estudios con ratas, poseen diferentes roles en la percepción de olores, asociando a la región anterior la *identidad* del olor y a la posterior la *cualidad* del mismo. Esto sugiere que dos vías podrían estar participando en la percepción olfativa (Kadohisa & Wilson, 2006) y por ende en el fenómeno repulsión-atracción. Así, la determinación de la actividad neuronal utilizando nuestro modelo y compuestos con distintas propiedades de repulsión-atracción puede ser útil para dilucidar este circuito.

La caracterización de los compuestos implicados en el fenómeno repulsión-atracción hacia los FF, sería esencial para poder poner en práctica procedimientos novedosos de adopción de corderos abandonados así como facilitar el desarrollo de la sensibilidad maternal hacia el propio cordero en ovejas que no lo hayan desplegado. Estas técnicas, serían clave para el sector productivo y estarían contribuyendo a disminuir la mortalidad de corderos y a reducir las pérdidas económicas que ella ocasiona a los productores.

PERSPECTIVAS

Este trabajo constituye una primera etapa en la identificación de los compuestos repulsivos-atractivos de los FF y de los mecanismos nerviosos implicados en el cambio de valor afectivo de estímulos con significado biológico.

Las perspectivas de este trabajo implican:

- ♣ Probar el valor repulsivo-atractivo de orina, sangre y plasma en las distintas etapas reproductivas de la oveja para evaluar las semejanzas LA-sangre/plasma y ALA/orina.

- ♣ Profundizar en el conocimiento de las redes y áreas neuronales involucradas en el fenómeno repulsión-atracción. En este sentido, la expresión de c-Fos, un marcador de actividad neuronal, nos permitiría identificar qué redes controlan el procesamiento de olores cuyo valor varía de acuerdo a cambios internos, como el estadio reproductivo. Así, podríamos evaluar qué áreas se activan cuando un olor tiene valor neutro previo al parto y adquiere uno atractivo durante el mismo y cotejarlo con el de otro repulsivo-atractivo o repulsivo-repulsivo.

El presente informe de pasantía se enmarca en el Proyecto CSIC-Sector Productivo, 2008: “Procedimientos de adopción de corderos y búsqueda de refugio en ovejas (*Ovis aries*) post-parturientas: uso de fracciones atractivas del líquido amniótico y método de estimulación vagino-cervical” del cual es responsable la Dra. Annabel Ferreira.

Este trabajo fue presentado en las XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias 2010. *Repulsión y atracción diferencial hacia distintos fluidos fetales en ovejas (Ovis aries)*. E. Cawen, M. Alsina, V. Olivera, H. Rodríguez, M.J. Zuluaga, D. Agrati, N. Uriarte, P. Poindron, G. Banchemo y A. Ferreira.

REFERENCIAS

- Bacchi Modena, A., & Fieni, S. (2004). *Acta Bio Medica Ateneo Parmense*, 75, 11-13.
- Berre, E.L., Béno, N., Ishii, A., Chabanet, C., Etiévant, P. & Thomas-Danguin, T. (2008). *Chemistry Senses*, 33, 389–395.
- Douglas, A.J., Johnstone, L.E., Leng, G. (2007). *Physiology & Behavior*, 91, 352-365.
- Huntington, J.A. & Stein, P.E. (2001). *Journal of Chromatography*, 756, 189-198.
- Jainudeen, M.R. & Hafez, E.S.E. (2002) Gestación, fisiología prenatal y parto. En: Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. 7ª Edición. (pp.144-159). McGraw-hill.
- Johnson, M.H. (2007). The fetus and its preparations for birth. En: *Essential Reproduction*. 6th edition. (pp. 222-243). Blackwell Publishing: Australia
- Keller, M., Meurisse, M., & Lévy, F. (2005). *Neuroscience*, 133, 359–369.
- Keller, M., Perrin, G., Meurisse, M., Ferreira, G., & Lévy, F. (2004). *European Journal of Neuroscience*, 20, 3433-3441.
- Kadohisa, M. & Wilson, D.A. (2006) *PNAS*, 103, 15206–15211
- Kwon, H., Spencer, T.E., Bazer, F.W., & Wu, G. (2003). *Biology of Reproduction*, 68, 1813–1820.
- Lévy, F., Gervais, R., Kindermann, U., Litterio, M., Poindron, P., & Porter, R. (1991). *Applied Animal Behaviour Science*, 31, 101–110.
- Levy, F. & Keller, M. (2009). *Behavioural Brain Research*, 200, 336–345.
- Lévy, F., Kendrick, K., Keverne, E. B., Porter, R. H., & Romeyer, A. (1996). *Advances in the Study of Behavior*, 25, 385–473.
- Lévy, F., Locatelli A., Piketty, V., Tillet, Y., & Poindron, P. (1995) *Physiology and Behavior*, 57,97-104.
- Lévy, F., Poindron, P., & Le Neindre, P. (1983). *Physiology and Behavior*, 31, 687–692.
- Lévy, F. & Poindron, P. (1984). *Biology oh Behavior*, 9, 271-278.
- Lévy, F., & Poindron, P. (1987). *Animal Behavior*, 35, 1188-1192.
- Liu, H., Zheng, Z., & Wintour, E.M. (2008). *Placenta*, 29, 840-847.
- Mellor, D.J. & Slater, J.S. (1971). *Journal Physiology*, 217, 573-604.

- McKenna, P. (1984). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78, 663-667.
- Morris, I.G. & Barron, A.A (1980). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1, 153-16
- Poindron, P. (2001). *Biología de la reproducción II*, 301-322.
- Poindron, P., Le Neindre, P., Raksanyi, I., Trillat, G., & Orgeur, P. (1980). *Reproduction Nutrition Development*, 20, 817-826.
- Poindron, P., & Lévy, F. (1990). En: N. A. Krasnegor & R. B. Bridges (Eds.), *Mammalian parenting: Biochemical, neurobiological and behavioral determinants* (pp. 133-156). New-York: Oxford University Press.
- Poindron, P., Lévy, F., & Keller, M. (2007). *Developmental Psychobiol* 49: 54-70.
- Poindron, P., Lévy, F., & Krehbiel, D. (1988). *Psychoneuroendocrinology*, 13, 99-125.
- Poindron, P. & Le Neindre, P. (1980). *Advances in the Study of Behavior*, 11, 75-119.
- Poindron, P., Le Neindre, P., Levy, F., Keverne, E.V. (1984). *Biology of Behavior*, 9, 65-88.
- Poindron, P., Terrazas, A., Navarro Montes de Oca, M.L., Serafin, N. & Hernandez, H. (2007). *Hormones and Behavior*, 52, 99-105.
- Romeyer, A., Poindron, P. & Orgeur, P. (1994). *Physiology and Behavior*, 56, 693-700.
- Ross, M.G., Ervin, G., Rappaport, V.J., Youssef, A., Leake, R.D. & Fisher, D.A. (1988). *Biology Neonate*, 53, 98-104.
- Siegel, S & Castellan, N.J (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: McGraw-Hill.
- Williams, M.A., Wallace, S.S., Tyler, J.W., McCall, C.A., Gutierrez, A. & Spano, J.S. (1993). *Theriogenology*, 40, 1251-1257.
- Wintour, E.M., Alcorn, D., McFarlane, A., Moritz, K., Potocnik, S.J., & Tangalakis, K. (1994). *American Journal of Physiology*, 266, 1174-1181.