



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación de los componentes atractivos y repulsivos de fluidos fetales en ovejas (*Ovis aries*) parturientas

Br. Valentina Olivera



Tribunal: **Dra. Annabel Ferreira**
 Dra. Ana Silva
 Dr. Andrés González
 Dra. Natalia Uriarte

Tutora: Dra. Natalia Uriarte
Co-tutora: Dra. Annabel Ferreira

Diciembre, 2010

Agradecimientos

A toda mi familia, por el apoyo incondicional y el estímulo constante para que haga lo que más me gusta hacer.

A mis amigas de siempre: Fabi, Caro, Gabi. Juntas en todas.

A mi compañera de estudio, de pasantía y sobre todo mi gran amiga Marce.

A Poindron y Georgget por sus aportes a este trabajo.

Al tribunal por sus comentarios y disponibilidad: Andrés González y Ana Silva. Gracias a Andrés por sus ideas para el fraccionamiento y por permitirnos trabajar en su laboratorio.

A Majito por su buena onda y a Dani por enseñarme, con paciencia.

A Nati, por enseñarme, exigirme, guiarme...y hacerme pensar!

A Anna, por dejarnos ser parte de su gran equipo.

ÍNDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Hipótesis de trabajo	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
Materiales y Métodos	6
<i>Animales.....</i>	6
<i>Colecta de los FF.....</i>	6
<i>Aislamiento de las fracciones de los fluidos fetales</i>	6
<i>Pruebas comportamentales</i>	8
1. <i>Evaluación de las fracciones de FF por prueba de preferencia con comida antes del parto</i>	8
2. <i>Evaluación de las fracciones de FF en el peri-parto: prueba con bolsas .</i>	9
<i>Procedimiento experimental</i>	9
<i>Análisis estadístico</i>	10
Resultados.....	11
<i>Pruebas de repulsión durante el período pre-parto</i>	11
<i>Pruebas de atracción durante el período periparto.....</i>	13
Discusión	14
<i>Posibles mecanismos neurales implicados en el fenómeno repulsión- atracción</i>	17
Perspectivas.....	20
Referencias.....	21

Resumen

En cualquier estadio del ciclo reproductivo, la oveja manifiesta repulsión hacia los fluidos fetales (FF) expulsados durante el parto. Sin embargo, éstos se vuelven altamente atractivos minutos antes del parto hasta unas horas luego del mismo. Esta atracción facilita el establecimiento del vínculo madre-cría puesto que estimula no sólo el lamido hacia el cordero sino el comportamiento maternal. Hasta el momento, se desconoce qué componentes de los FF están involucrados en este fenómeno de repulsión-atracción. En el presente trabajo, nos planteamos como hipótesis que los mismos componentes de los FF que resultan repulsivos antes del parto para las ovejas se tornan atractivos durante el mismo. Para evaluar esta hipótesis se realizó un fraccionamiento químico de un *pool* de FF mediante dos solventes orgánicos (hexano y diclorometano) con el objetivo de obtener distintos componentes de acuerdo a su polaridad. Obtuvimos tres fracciones: una acuosa luego de la primera extracción con hexano (A1), una segunda acuosa (A2) y otra no polar (DCM) luego de la extracción con diclorometano. Con el fin de identificar el valor repulsivo-atractivo de los mismos utilizamos pruebas de preferencia antes del parto y durante la expulsión fetal. Sólo la fracción acuosa A1 fue repulsiva para las ovejas durante el pre-parto mientras que las otras dos fracciones resultaron neutras. En cambio, en el peri-parto, las tres fracciones fueron altamente atractivas para las ovejas. En conclusión, sólo los componentes de una fracción (A1) estarían involucrados tanto en el fenómeno de repulsión como en el de atracción mientras que sustancias neutras adquieren un carácter atractivo al parto, sugiriendo que éste es un evento más generalizado que la repulsión.

Introducción

En las ovejas, el rápido desarrollo del comportamiento maternal luego del parto, es un evento esencial para la supervivencia del cordero. Los fluidos fetales (FF, líquido amniótico y líquido alantoideo), que cubren al cordero al nacer, se vuelven atractivos para la oveja y estimulan los lamidos y cuidados maternales (Lévy *et al.*, 1983; Alsina, 2010). Así, esta atracción facilita los comportamientos de lamido hacia el cordero y permite el establecimiento de un vínculo entre la oveja y su cordero (Arnould *et al.*, 1991). En contraste, los FF son altamente repulsivos para la oveja durante cualquier etapa del ciclo reproductivo excepto durante el corto período alrededor del parto (Lévy *et al.*, 1983).

La atracción por los FF, en principio, no depende de señales olfativas individuales puesto que la oveja se muestra atraída hacia sus propios FF como hacia los de cualquier otra oveja (Lévy *et al.*, 1983). Inclusive muestra atracción hacia FF de otras especies (como la vaca y la cabra), aunque el de la propia especie despertaría la mayor atracción (Arnould *et al.*, 1991). Luego del parto, los estímulos del cordero también despiertan una fuerte atracción no selectiva. Es decir, la oveja acepta a cualquier cordero que se le presente en ese momento como si fuera el propio (Poindron *et al.*, 1980; Poindron & Le Neindre, 1980), lo cual indicaría que hay, en ese período, un estado de receptividad maternal hacia señales comunes a cualquier neonato.

Estudios previos muestran que el efecto repulsivo así como el atractivo de los FF no se observan en ovejas anósmicas (Lévy *et al.*, 1983), indicando que el fenómeno de repulsión-atracción depende de señales olfativas.

Tanto el inicio del período sensible, durante el cual se desarrollan respuestas maternales, como la atracción hacia los FF, dependen del aumento de la liberación de estrógenos placentarios, que ocurre al final de la gestación, y de la estimulación vagino-cervical (EVC) generada durante el proceso del parto (Kendrick & Keverne, 1991; Keverne *et al.*, 1983; Lévy *et al.*, 1983; Poindron & Lévy, 1990; Poindron *et al.*, 1980, 1988).

Los FF jugarían un papel dual en el desarrollo del comportamiento maternal en la oveja, facilitando tanto la aceptación inmediata del cordero como el

establecimiento de su reconocimiento individual (Poindron *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de la importancia de éstos en los procesos de sensibilidad y selectividad maternas, se desconoce aún qué compuestos de los FF son los que provocan la fuerte atracción en el peri-parto.

Lévy (1981) realizó experimentos de preferencia con fracciones extraídas de FF únicamente en ovejas no parturientas. Luego de un fraccionamiento con hexano, este investigador demostró que los elementos repulsivos no serían los liposolubles y encontró que el carácter repulsivo de este fluido estaría presente en una única fracción de las cinco obtenidas a través del fraccionamiento por cloruro de metileno. Sin embargo, hasta el momento, desconocemos si los elementos repulsivos son los mismos implicados en la atracción luego del parto o si diferentes compuestos adquieren un carácter repulsivo y atractivo para las ovejas.

Hipótesis de trabajo

Los compuestos de los FF responsables de la repulsión antes del parto son los mismos que están implicados en la atracción durante el parto.

Objetivo general

Determinar si los mismos componentes de los FF son repulsivos antes del parto y atractivos en el peri-parto.

Objetivos específicos

- Separar componentes de un *pool* de FF mediante un fraccionamiento químico basado en la polaridad de sus componentes.
- Determinar qué fracciones de los FF son repulsivas y atractivas para ovejas en pre-parto y peri-parto respectivamente.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ovejas (*Ovis aries*) multíparas de la raza Ideal en el establecimiento La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en el Departamento de Colonia (Ruta 50, Km 11). 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. La gestación se determinó mediante ecografía.

Las ovejas se alojaron en bretes individuales de 2.0 x 2.0 m una semana antes del final de la gestación para permitir su habituación, y se alimentaron con ración y agua *ad libitum*. Los partos fueron inducidos mediante la administración de 15 mg/animal i.m. de dexametasona en el día 145 de gestación y comenzaron 24-36 horas luego de dicha inyección.

Colecta de los FF

En una primera instancia, se colectaron los fluidos fetales (FF, líquido amniótico y líquido alantoideo) de 10 ovejas de las cuales se pudo determinar la cercanía del momento del parto.

Apenas se visualizó la primera vesícula, se realizó una punción de la misma con una aguja estéril para romperla y colectar el fluido en un frasco de vidrio, que se marcó y congeló inmediatamente.

Se colectaron 5,5 litros de FF que fueron refrigerados y trasladados al laboratorio de Ecología Química en Facultad de Química donde se realizó el fraccionamiento.

Aislamiento de las fracciones de los fluidos fetales

El total de FF colectado se filtró por gasa y centrifugó (en tubos de teflón) a 5000 rpm durante 20 minutos y a una temperatura de 4° C para separar sus componentes celulares. Luego se realizó el primer fraccionamiento químico, con hexano, un solvente no polar que permite la extracción de moléculas liposolubles.

El *pool* de FF fue colocado en una bola de decantación de 6 litros. A este *pool* se le

fue agregando gradualmente 1,5 litros del hexano hasta observar una separación de fases. Es decir, el procedimiento consistió en el agregado, en tres etapas, de aproximadamente medio litro de hexano a los 5,5 litros de FF. De esta manera se pudieron separar 2 litros de FF cada medio litro de hexano, aproximadamente. Así, obtuvimos en la bola de decantación 3 fases: una fase de FF, el hexano y una emulsión con mucha espuma entre ambos.

Se obtuvieron de este modo 4 litros de una fracción acuosa 1 (A1), 950 ml de una fracción hexano y una emulsión sin separar la cual no se pudo fraccionar luego de utilizar distintos métodos (temperatura, centrifugado, agregado de sal).

La fracción hexano obtenida fue colocada en un rotavapor (o evaporador rotatorio) para evaporar el solvente, el cual tiene un olor muy fuerte que podría interferir en las pruebas. Este hexano se rotavaporó durante algunos minutos a presión reducida y se obtuvo una masa sólida muy escasa (0,6 mg) por lo que esta fracción así como la emulsión sin separar no fueron utilizadas en el experimento.

A la mitad del volumen obtenido de A1 (2 litros aproximadamente) se le agregó carboximetilcelulosa (CMC). Ésta fue utilizada ya que, disuelta en agua, mimetiza la consistencia viscosa de los FF, es inodora y neutra (no es repulsiva ni atractiva para las ovejas, observaciones no publicadas).

La otra mitad de A1 (otros 2 litros aproximadamente) fue utilizada para realizar un segundo fraccionamiento. Éste consistió en la mezcla de los 2 litros de A1 con el solvente diclorometano (DCM) el cual permite extraer las moléculas relativamente apolares, llevando a cabo el mismo procedimiento de tres etapas descrito anteriormente para el hexano.

Al volumen de DCM extraído también se lo llevó a sequedad mediante la utilización de un rotavapor para obtener un solvente sin DCM. El residuo sólido obtenido fue retomado en agua hasta llegar al mismo volumen inicial (aproximadamente 1 litro). Se le agregó CMC tanto a la fracción acuosa 2 (A2) como a la fracción DCM obtenidas en esta segunda etapa.

Para ser utilizados como controles en las pruebas de preferencia, tanto el hexano como el DCM fueron llevados a sequedad y retomados en agua hasta llegar a un volumen igual al de las fracciones A1, A2 y DCM (1 litro aproximadamente cada

una). Luego se les agregó también CMC. La fracción hexano con CMC fue utilizada como control para la fracción A1 mientras que la fracción DCM con CMC para A2 y DCM (Ver Fig. 1).

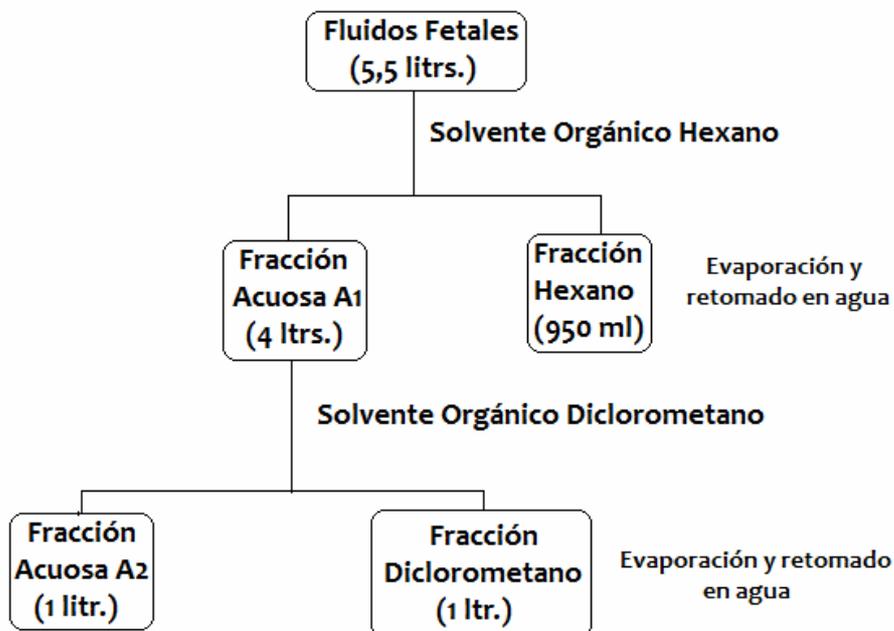


Figura 1. Esquema del fraccionamiento químico realizado a los fluidos fetales para obtener las tres fracciones utilizadas en las pruebas comportamentales.

Pruebas comportamentales

1. Evaluación de las fracciones de FF por prueba de preferencia con comida antes del parto

Esta prueba fue validada por Lévy (1981) y consistió en presentarle a la oveja dos recipientes cada uno con 40 g de ración, uno mezclado con 20 ml de una de las fracciones a evaluar y otro con el mismo volumen de solución control. Ambos recipientes se colocaron frente a la oveja con 10 cm de distancia entre ellos (Fig. 2A). Posteriormente, se registró, durante 3 minutos, la latencia y el tiempo de ingesta. Luego de finalizada la prueba, se retiraron los recipientes y la comida fue pesada para calcular el total de ración ingerida. Los recipientes fueron lavados y secados antes de ser usados en la siguiente prueba.

2. Evaluación de las fracciones de FF en el peri-parto: prueba con bolsas

Previo a la expulsión fetal (rotura de membranas, visualización de las patas del cordero por el canal de parto) o inmediatamente luego del parto (en ese caso, se retiraba al cordero del brete para evitar la interacción madre-cría) se determinó si el animal mostraba atracción hacia los FF puros colocados frente a su hocico en una bandeja. Solo aquellos animales que mostraran atracción hacia los FF fueron sometidos a la prueba de preferencia. La misma consistió en colocar en el brete, frente a la oveja, dos bolsas de goma de agua caliente (aprox. 37°C) forradas con un tejido similar a la piel del cordero mojada una de ellas con 10 ml de una de las fracciones de FF y la otra con el mismo volumen de solución control (Fig. 2B). Se registró, durante tres minutos la latencia (tiempo desde que se presenta la bolsa hasta que el animal comienza a olfatear o lamer) y tiempo total de lamido de cada bolsa. Esta prueba fue validada para el registro de atracción hacia los FF (Alsina, 2010).

Procedimiento experimental

Pre-parto: Las tres fracciones A1, A2 y DCM con sus respectivos controles, se evaluaron en los modelos de preferencia con comida previamente descritos 24 a 30 horas luego de la inyección de dexametasona y aproximadamente 10 a 24 horas antes del parto.

Las ovejas permanecieron en el brete sin comida ni agua durante al menos 2 horas antes de la prueba. De esta manera, el rechazo de comida contaminada con FF por parte de un animal relativamente hambriento indicaría aversión a consumir estos FF.

Cada oveja fue probada tres veces por la preferencia por A1, A2 y DCM y sus respectivos controles. Cada prueba fue separada de la siguiente por un período de 3 minutos. El orden de las pruebas y la localización de los recipientes (derecha-izquierda) fueron contrabalanceados.

Peri-parto: Durante este período, los animales se probaron con cada una de las fracciones A1, A2 y DCM y sus respectivos controles, en tres pruebas sucesivas de preferencia. Cada prueba se separó por 3 minutos de la siguiente. Como se

describió previamente, se utilizó un diseño contrabalanceado, alternando la ubicación y el orden de las fracciones para evitar posibles sesgos espaciales y/o provenientes de la experiencia anterior

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando tests no paramétricos, para medidas dependientes (Siegel, 1956). El test de Wilcoxon fue utilizado para comparar dos grupos y el test de Friedman Análisis de Varianza por Rango (análogo al Test ANOVA) para más de dos grupos. Los resultados se expresan en medianas (RSIQ) y se consideran estadísticamente significativos cuando $p \leq 0,05$.

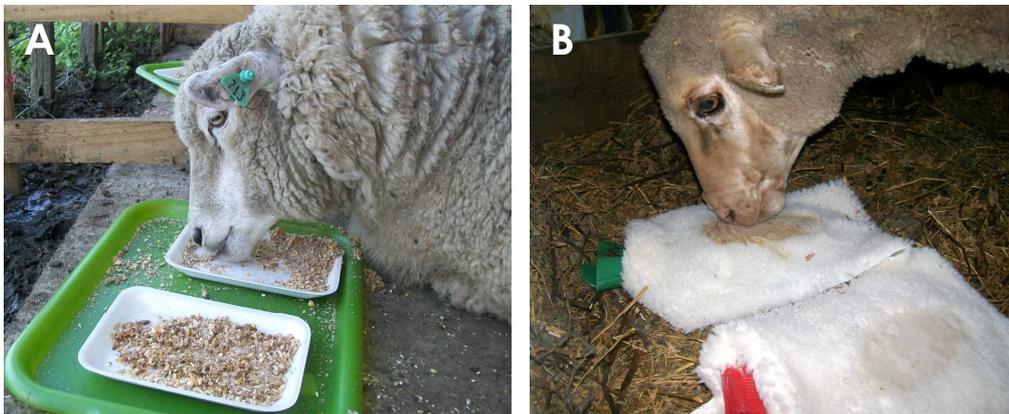


Figura 2. A. Prueba de preferencia con comida en el pre-parto. **B.** Prueba de preferencia con bolsas en el peri-parto.

Resultados

Del total de ovejas preñadas, 18 parieron entre 24 a 36 horas luego de la administración de dexametasona. Según los criterios de inclusión fijados para las pruebas de preferencia en pre-parto (consumir más del 5% del alimento ofrecido y durante más de 5 segundos), se descartaron cinco animales, asumiendo que éstos no tenían interés en la prueba. Por este motivo, se realizaron las pruebas de preferencia con comida antes del parto en 13 ovejas. Luego del parto, solo 11 de las 13 ovejas parturientas que mostraron interés en la prueba anterior, fueron incluidas en el análisis porque cumplieron el criterio de inclusión de esta prueba (olfatear al menos una de las bolsas).

Pruebas de repulsión durante el período pre-parto

La ración contaminada con la fracción obtenida en la primera fase del fraccionamiento, A1, fue significativamente menos consumida que la ración control. Tanto el porcentaje de consumo del alimento ofrecido en relación al total ingerido (A1: 6,3 (9,8); Control: 93,8 (11,0); T= 0,0; p=0,01) como el tiempo de alimentación total (A1= 2,0 (9,0); Control= 66,0 (12,0); T= 6,0; p=0,01) fueron significativamente menores para la fracción A1 en comparación con su control (Fig. 3A y B).

La ración contaminada con la fracción A2 fue consumida en forma similar que su control, ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de consumo del total ingerido (A2= 50,0 (7,1); Control= 50,0 (7,1); T= 16,5; p=ns) ni en el tiempo durante el cual las ovejas consumen el alimento (A2= 45,0 (19,0); Control= 52,0 (14,0); T= 28,0; p=ns, Fig. 3A y B).

Con respecto al alimento contaminado con la fracción DCM se observó que también fue consumido de forma similar a su control, ya que no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de consumo del total ingerido (DCM= 34,5 (16,3); Control= 65,5 (16,3); T= 14,0; p=ns) y en el tiempo de alimentación total (DCM= 30,0 (26,0); Control= 46,0 (18,0); T= 26,0; p=ns; Fig. 3A y B).

Como se muestra en la tabla 1, la latencia a consumir el alimento fue significativamente mayor para las fracciones A1 y DCM respecto a sus controles (T=4,0 y T=14,5 respectivamente) mientras que no se observaron diferencias entre las

latencias a consumir A2 y su control ($T=38,0$, $p=ns$). Tampoco se encontraron diferencias entre las fracciones ($Xr2=3,24$, $p=ns$) y entre los controles ($Xr2=2,21$, $p=ns$) ni en las tasas de consumo de los alimentos contaminados con controles o fracciones (Tabla 1).

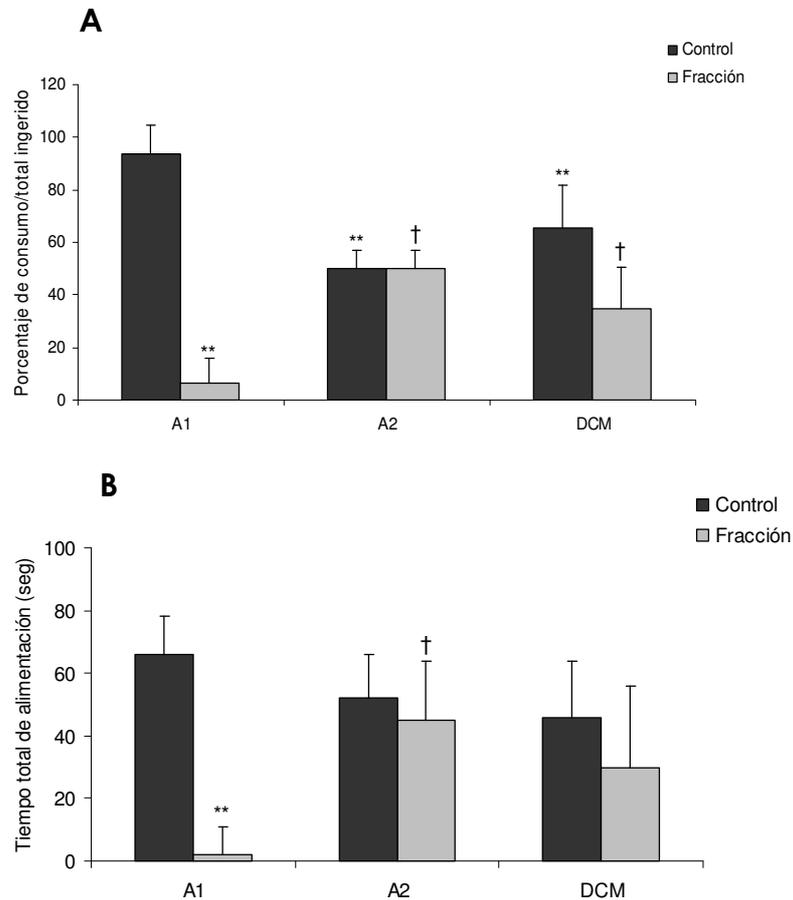


Figura 3. A. Porcentaje de ración consumida contaminada con fracciones y controles en relación al total de alimento ingerido. **B.** Tiempo de alimentación total de ración contaminada con las fracciones y sus controles. Los datos se muestran en medianas (RSIQ). Se utilizaron los tests de Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas. ** $p \leq 0,05$ respecto a control de A1, † $p \leq 0,05$ respecto a A1.

Tabla 1. Latencia a probar el alimento (s) y tasa de consumo (g/s; cantidad de alimento consumido/tiempo) para cada oveja durante el pre-parto. Los datos se muestran en medianas (RSIQ). Se utilizó los tests de Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas ** $p \leq 0,05$ respecto a controles.

	Latencia	Tasa
CA1	3,0 (6,0)	0,9 (0,4)
A1	146,0 (54,5)**	1,0 (0,6)
CA2	10,0 (41,5)	0,9 (0,3)
A2	34,0 (53,0)	1,0 (0,3)
CDCM	3,0 (5,0)	0,9 (0,3)
DCM	56,0(62,0)**	0,8 (0,3)

Pruebas de atracción durante el período peri-parto

Las ovejas lamieron, durante la mayor parte del tiempo de prueba, las bolsas mojadas con las tres fracciones, mientras que no demostraron interés en las bolsas mojadas con CMC (Fig. 4). En este sentido, las latencias a lamer las bolsas mojadas con las fracciones fueron significativamente menores en comparación con las mojadas con control (Tabla 2).

No se observaron diferencias significativas en el tiempo total de lamidos entre las bolsas mojadas con las tres fracciones (A1=37,0 (38,8); A2= 48,0 (32,0); DCM= 26,0 (37,0); $X^2r=1,16$, $p=ns$; Fig 4) ni en las latencias a lamer las mismas ($X^2r =0,19$, $p=ns$, Tabla 2).

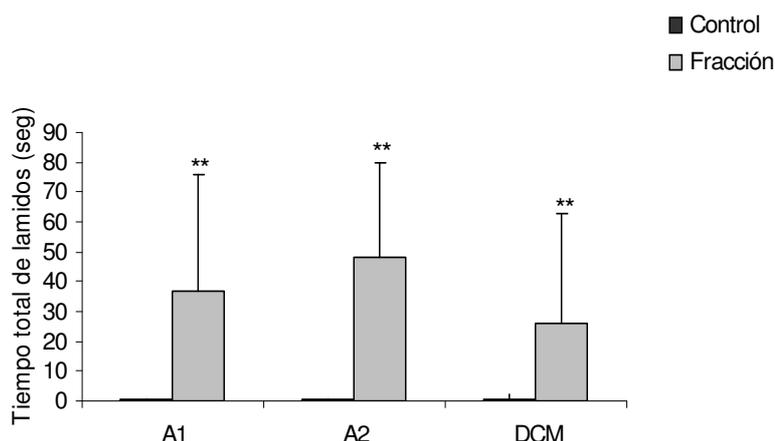


Figura 4. Tiempo de lamidos total de cada bolsa mojada con fracciones y sus controles. Los datos se muestran en medianas (RSIQ). Se utilizaron el test Friedman de Varianza por Rangos y el test de Wilcoxon para muestras pareadas. No existieron diferencias significativas entre las fracciones. ** $p \leq 0,05$ respecto a control de cada fracción.

Tabla 2. Latencia a lamer las bolsas (s) durante el total de la prueba de preferencia en el peri-parto. Se muestran los datos en medianas (RSIQ). Se utilizaron los tests de Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas. ** $p \leq 0,05$ respecto a controles.

	Latencia
CA1	180,0 (0,0)
A1	10,0 (87,0)**
CA2	180,0 (15,5)
A2	7,0 (16,3)**
CDCM	180,0 (30,5)
DCM	10,0 (66,0)**

Discusión

Los resultados muestran que durante el pre-parto, únicamente la fracción A1 fue repulsiva mientras que las fracciones A2 y DCM, resultaron neutras para las ovejas; por otra parte, todas las fracciones fueron atractivas durante el peri-parto.

La naturaleza repulsiva de la fracción acuosa A1, obtenida mediante la separación con hexano, cuya polaridad es nula y permitió extraer las moléculas liposolubles, indica que estas sustancias no estarían implicadas en la repulsión. Este resultado coincide con el de Lévy (1981) que mostró que luego de la extracción con hexano, el carácter repulsivo de los FF no se encontraba en la fracción liposoluble.

La separación de A1 mediante el solvente diclorometano, que presenta una polaridad mayor, condujo a la extracción de moléculas fuertemente cargadas (Lévy, 1981). La fracción A2 carecería de dichas moléculas las cuales si se encontrarían en la fracción DCM.

El hecho de que la fracción A1 se separa en dos partes que no resultaron repulsivas, sugiere que al menos dos componentes en A1 se complementan adquiriendo un

valor repulsivo. Es decir, estaríamos descartando que un único compuesto en A1 fuera el responsable de la repulsión puesto que debería encontrarse en A2 o en DCM y continuar conservando una naturaleza repulsiva.

Una posible alternativa, es que ocurra lo que se conoce como sinergismo, fenómeno en el cual un compuesto potencia su efecto odorífero en presencia de otro. Tal vez existan compuestos en A1 que se potencien entre sí causando un efecto repulsivo en las ovejas pre-parturientas. En este sentido, se ha visto que la repulsión de las ovejas hacia las heces de perro se debe a varios componentes de las mismas que actúan sinérgicamente (Arnould *et al.*, 1998). Estos compuestos serían varios ácidos grasos, cuyas cadenas se componen de 4 a 18 carbonos y tendrían un efecto repulsivo parcial ya que otros componentes como aldehídos, alcoholes y metilquetonas, pueden contribuir a dicho efecto (Arnould *et al.*, 1998).

También en humanos, se ha reportado que ciertas mezclas resultan mucho más repulsivas comparadas con sus propios compuestos presentados individualmente, lo que sugiere que determinadas combinaciones de sustancias odoríferas podrían inducir un olor aún más repulsivo (Laing *et al.*, 1994).

Una tercera posibilidad es que determinados componentes funcionen en conjunto en A1, y no sean percibidos como repulsivos por las ovejas cuando se separan en A2 y DCM. De esta forma, la mezcla de ciertos componentes de los FF sería la que adquiere el valor negativo responsable de la repulsión. En este sentido, se ha observado que en mezclas en las cuales sus compuestos son percibidos con una identidad particular (por ejemplo, aroma a chocolate o piña), éstos deben estar en estricta proporción, ya que pequeñas variaciones de concentración modifican la percepción del olor de dicha mezcla y ciertas variaciones hacen que emerja una nueva cualidad odorífera no presente originalmente en la mezcla (Le Berre *et al.*, 2008). Estos datos resaltan la importancia de la concentración de cada compuesto presente en las fracciones obtenidas en este experimento.

Además de sus concentraciones, es importante tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de cada componente, ya que se ha visto que son importantes para la percepción de olores atractivos en humanos y ratones (Mandairon *et al.*, 2009). Estos

autores encontraron una fuerte asociación entre la estructura química de los odorantes y su valor hedónico en ambas especies (Mandairon *et al.*, 2009).

El hecho de que solo algunos componentes de los FF, específicamente los que se encuentran en A1, resultaran repulsivos en el pre-parto, indica que en mezclas de sustancias químicas no todos los componentes pueden provocar algún tipo de respuesta en los individuos. En este sentido, en la polilla *Tecia solanivora*, sólo algunos compuestos son efectivos para atraer machos y tres de los seis componentes de la feromona sexual de esta polilla caracterizados por Bosa *et al.* (2005) producen respuestas de atracción en los machos.

De forma interesante, observamos que durante el período alrededor del parto, todas las fracciones resultan igualmente atractivas para las ovejas. Esto sugiere que mientras algunos componentes (los presentes en A1) involucrados en la repulsión son también responsables de la atracción, otras sustancias neutras durante el pre-parto, adquieren características atractivas durante el parto. Este resultado indicaría que nuestra hipótesis es válida para la fracción A1 pero no para las fracciones A2 y DCM. Además, el hecho de que existan más compuestos involucrados en la atracción que en la repulsión podría señalar que la atracción es un fenómeno más generalizado que la repulsión.

Sin embargo, aunque la atracción hacia los FF aparece como un evento generalizado dado que las ovejas también muestran aceptación por albúmina y sangre, la aversión por otras sustancias como las fecas de perro (potencial predador de las ovejas), se mantiene (datos no publicados). Esto indica que hay una atracción selectiva hacia los FF en el momento del parto.

Está bien documentado que los FF son fuertemente repulsivos para la oveja durante cualquier estadio de su ciclo reproductivo excepto durante un corto período alrededor del parto cuando los mismos son muy atractivos (Lévy *et al.*, 1983). Sin embargo, el LA y el ALA por separado presentan distinto valor afectivo en el pre-parto y peri-parto. Mientras que el LA es repulsivo durante el pre-parto y atractivo en el peri-parto, el ALA resulta neutro en el pre-parto y también atractivo en el peri-parto (Alsina, 2010). Se puede considerar entonces que los principales componentes

involucrados en el fenómeno repulsión-atracción son los que se encuentran en el LA.

Es necesario tener presente que el *pool* de FF procesados en este experimento contenía no sólo LA sino también ALA, por lo cual no podemos descartar una influencia del mismo reduciendo la repulsión o la atracción. Efectivamente hay diferencias importantes entre ambos fluidos. En la oveja, se ha estimado que el contenido en compuestos nitrogenados es más alto en el ALA que en el LA (Alexander *et al.*, 1958). La concentración de urea y creatinina aumenta progresivamente a lo largo de la gestación en el LA. Sin embargo, el ALA muestra una disminución de creatinina y un aumento de urea a partir de la mitad de la gestación (Wintour *et al.*, 1994). En cuanto al contenido hormonal, se ha visto que hay una baja concentración de estrógenos al momento del parto tanto en el ALA como en el LA (Carnegie y Robertson, 1978). Debido a estas diferencias entre ambos fluidos, es necesario realizar más experimentos para determinar qué componentes del LA) y del ALA despiertan reacciones repulsivas y atractivas en los animales.

Posibles mecanismos neurales implicados en el fenómeno repulsión- atracción

El cambio entre el comportamiento de repulsión y el de atracción hacia los FF ocurre en un período muy corto alrededor del parto y se ha establecido que depende fundamentalmente del olfato (Lévy *et al.*, 1983). La anosmia produce una desaparición del carácter repulsivo hacia los FF en ovejas no parturientas y también afecta la atracción en ovejas parturientas (Lévy *et al.*, 1983). Este cambio en el valor afectivo de los FF ocurre en respuesta a los eventos del parto, sin embargo, hasta el momento no se conocen los mecanismos que subyacen a dicho cambio.

Si bien en este trabajo no realizamos estudios sobre las bases neurales que controlan este fenómeno de repulsión-atracción en ovejas, el hecho de haber determinado sustancias activas en los FF podría permitir determinar si los mismos mecanismos implicados en la repulsión son los responsables de la atracción. En este sentido, en *Drosophila melanogaster* existen dos centros olfativos de orden superior, el *mushroom body* (MB) y el asta lateral, que reciben entradas olfatorias desde el lóbulo antenal. Cuando ocurre un bloqueo de la neurotransmisión en el MB, las moscas continúan siendo capaces de evitar olores repulsivos mientras que la

atracción hacia ciertos olores se ve alterada. Esto sugiere que la información olfativa de la atracción y la repulsión se procesa en forma paralela en los centros olfativos del cerebro, el MB procesa la atracción y el asta lateral la repulsión (Wang *et al.*, 2003). A su vez, las respuestas espontáneas para discriminar entre la identidad e intensidad de los olores están segregadas a nivel del MB.

También en la abeja melífera (*Apis mellifera*) el procesamiento olfativo se encuentra funcionalmente dividido en dos tipos de neuronas de proyección: las que corren por el tracto anteno-cerebral lateral y las que lo hacen por la parte medial del mismo. Cada vía se activa de acuerdo a la concentración del compuesto odorífero (Yamagata *et al.*, 2009).

Una segunda hipótesis es que ambos fenómenos estén mediados por los mismos circuitos nerviosos, con receptores específicos o mecanismos de señalización diferentes. Apoyando esta idea, resultados en *Caenorhabditis elegans*, muestran que una sola neurona sensorial media las respuestas tanto a olores repulsivos como atractivos. Esto se logra ya que la misma neurona olfativa emplea dos mecanismos distintos de señalización (a través de diferentes tipos de segundos mensajeros), uno para la atracción y otro para la repulsión (Tsunoaki *et al.*, 2008).

Por otra parte, distintos tipos de receptores, podrían estar participando, siendo sensibles a odorantes específicos. Por ejemplo, en el pez dorado (*Carassius auratus*) existen receptores específicos para poliaminas (las que resultan atractivas para el pez) que se ubican de forma independiente a los receptores de otras sustancias, incluso se encuentran varios tipos de receptores para las diferentes clases de poliaminas (Rolen *et al.*, 2009). Sin embargo, en *C.elegans* se ha visto que el receptor para diacetil puede mediar diferentes respuestas según la neurona en la cual se encuentre (Troemel *et al.*, 1997). Cuando dicho receptor se expresa y es activo en neuronas AWB, el gusano muestra repulsión hacia el diacetil; pero si se expresa en neuronas AWA dicho nemátodo presenta atracción hacia el mismo compuesto. Esto indica que las neuronas olfativas juegan un rol importante en la codificación de la información quimiosensitiva y que las mismas requieren de distintas vías de señalización (Troemel *et al.*, 1997).

En mamíferos, el procesamiento de los estímulos olfativos se realiza en la corteza piriforme, que recibe entradas olfativas desde el bulbo olfatorio. En la rata, se han diferenciado dos grandes regiones: la corteza piriforme anterior que percibe la identidad de determinado olor y la corteza piriforme posterior la cual codifica para la cualidad del olor (Kadoisha y Wilson, 2006). Ambas regiones se ven afectadas de forma distinta cuando las mezclas odoríferas percibidas son familiares o desconocidas (Kadohisa y Wilson, 2006).

Es posible que el cambio en el valor repulsivo a atractivo de los FF en las ovejas periparturientas, se deba a la influencia de los eventos que ocurren durante el peri-parto sobre las áreas relacionadas a la percepción de los estímulos o a regiones implicadas a la asignación de valores hedónicos a los mismos. La rapidez con que se establece el fenómeno repulsión-atracción al momento del parto sugiere que éste se debe a que factores asociados con la expulsión del neonato influyen en áreas de procesamiento de estímulos olfativos (Poindron *et al.*, 1988). Es sabido que la estimulación vagino-cervical facilita el comportamiento maternal influenciando el sentido del olfato (Keverne *et al.*, 1983) y promueve la atracción hacia los FF y el consiguiente lamido del cordero. Además, ha sido posible reintroducir atracción en ovejas (incluso en no gestantes) gracias a la administración de estradiol y cinco minutos de estimulación vagino-cervical artificial (Poindron *et al.*, 1988).

Uno de los procesos neuroendocrinos desencadenados por la estimulación vagino-cervical propia del parto es la liberación de oxitocina a la circulación periférica y estructuras cerebrales. Esta hormona está involucrada en el establecimiento del comportamiento maternal en la oveja (Keverne *et al.*, 1983; Poindron *et al.*, 1988). También se ha visto que la noradrenalina puede participar en el establecimiento del reconocimiento olfatorio de la madre a su cordero (Poindron *et al.*, 1988)

En conclusión, el fenómeno repulsión-atracción hacia los FF en ovejas depende, en parte, del cambio en el valor afectivo de algunas moléculas que pasan de ser repulsivas en pre-parto a atractivas al parto, mientras que un número mayor de compuestos odoríferos neutros se volvieron atractivos durante el peri-parto, sugiriendo que la atracción es un evento más generalizado que la repulsión.

Perspectivas

Este trabajo es un primer paso en la identificación de los compuestos de los fluidos fetales responsables del fenómeno repulsión-atracción en ovejas durante su ciclo reproductivo.

La determinación de los compuestos atractivos en los FF, que pudieran eventualmente sintetizarse, tendría una gran importancia para facilitar la adopción de corderos ajenos y para el desarrollo de la sensibilidad maternal hacia el propio cordero en ovejas que no lo hayan desplegado, contribuyendo a disminuir la mortalidad perinatal en ovinos. Esto tendría una gran importancia para el sector productivo. En este contexto, es necesario realizar una caracterización mas fina de estos componentes, mediante técnicas clásicas como separación por destilación, precipitación y extracción; por reacciones químicas y cromatografía.

Este trabajo aporta además al estudio de los mecanismos nerviosos implicados en la percepción y el procesamiento de estímulos con relevancia biológica, como los fluidos fetales; así como también en la asignación de valores hedónicos y cambios en el valor afectivo de estos.

Se logró llevar a cabo este trabajo gracias al apoyo financiero de CSIC: Proyecto CSIC-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", responsable: Dra. Annabel Ferreira.

Los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias.

Este trabajo fue presentado mediante póster en las XIII Jornadas SUB (Mayo de 2010): Los componentes de los fluidos fetales responsables de la repulsión en el parto son distintos a los involucrados en la atracción en el parto en la oveja (*Ovis aries*). V Olivera, M Alsina, E Cawen, MJ Zuluaga, N Uriarte, D Agrati, P Poindron, G Banchemo, A Gonzalez, A Ferreira.

Referencias

- Alsina, M (2010) Repulsión y atracción diferencial hacia distintos fluidos fetales en ovejas (*Ovis aries*). Tesis de grado. Universidad de la República.
- Alexander, D.P; Nixon, D.A; Widdas, W.F; Wohlzogen, F.X (1958) Gestational variations in the composition of the foetal fluids and foetal urine in the sheep. *Journal Physiology* 140:1-13.
- Arnould, C; Piketty, V; Lévy, F. (1991) Behaviour of ewes at parturition toward amniotic fluids from sheep, cows and goats. *Applied Animal Behaviour. Science* 32: 191–196.
- Arnould, C; Malosse, C; Signoret, J.P; Descoins, C (1998) Which chemical constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep? *Journal of Chemical Ecology* 24: 559-576.
- Bacchi Modena, A; Fieni, S (2004) Amniotic fluids dynamics. *Acta Biomédica Ateneo Parmense*. 1:11-13.
- Bosa, C.F; Witzgall, P; Bengtsson, M; Cotes P, A.M (2005) Caracterización biológica de los compuestos de la hormona sexual de *Tecia solanivora* Polvony (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista colombiana de Entomología*. 31.
- Carnegie, J.A; Robertson, H.A (1978). Conjugated and unconjugated estrogens in fetal and maternal fluids of the pregnant ewe: A possible role for estrone sulfate during early pregnancy. *Biology of Reproduction*. 19: 202-211.
- Kadohisa, M; Wilson, D.A (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *PNAS*. 103: 41.
- Keller, M; Meurisse, M; Lévy, F (2005). Mapping of Brain Networks Involved In Consolidation of Lamb Recognition Memory. *Neuroscience*. 133: 359–369.
- Kendrick, K. M; Keverne, E. B (1991). Importance of progesterone and estrogen priming for the induction of maternal behavior by vaginocervical stimulation in sheep: effects of maternal experience. *Physiology and Behavior* 49: 745–750.
- Keverne E.B; Lévy F; Poindron P; Lindsay D.R (1983). Vaginal Stimulation: An important determinant of maternal bonding in sheep. *Science* 219: 81-83.

Laing D.G; Eddy A; Best J (1994). Perceptual characteristics of binary, trinary and quaternary odor mixtures consisting of unpleasant constituents. *Physiology and Behavior* 56: 81-93.

Le Berre, E; Béno, N; Ishii, A; Chabanet, C; Etiévant, P; Thomas-Danguin, T (2008). Just noticeable differences in component concentrations modify the odor quality of a blending mixture. *Chemical senses* 33: 389-395.

Lévy, F. (1981). Tesis de Maestría. Existence et controle de l'attraction par le liquide amniotique chez la brebis (*Ovis aries*). *Physiologie de la Reproduction*. Université de Paris VI.

Lévy, F; Poindron, P; Le Neindre, P (1983) Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiology and Behavior* 31: 687–692.

Mandairon, M; Poncelet, J; Bensafi, M; Didier, A (2009) Human and mice express similar olfactory preferences. *Plos One* 4:4209-

Poindron, P; Le Neindre, P (1980) *Advances in the Study of Behavior*, 11, 75–119.

Poindron, P., Le Neindre, P., Raksanyi, I., Trillat, G., & Orgeur, P. (1980). Importance of the characteristics of the young in the manifestation and establishment of maternal behaviour in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 20, 817–826.

Poindron, P., Lévy, F., & Krehbiel, D. (1988). Genital, olfactory, and endocrine interactions in the development of maternal behaviour in the parturient ewe. *Psychoneuroendocrinology*, 13, 99–125.

Poindron, P; Lévy, F (1990) In N. A. Krasnegor & R. B. Bridges (Eds.), *Mammalian parenting: Biochemical, neurobiological and behavioral determinants* (133–156). New-York: Oxford University Press.

Poindron, P., Lévy, F., & Keller, M. (2007). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Developmental Psychobiol* 49: 54–70.

Rolen, S.H; Sorensen, P.W; Mattson, D; Caprio, J (2003) Polyamines as olfactory stimuli in the goldfish *Carassius auratus*. *The Journal of Experimental Biology*. 206: 1683-1696.

- Siegel, S (1956). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. New York: McGraw-Hill.
- Troemel, E.R; Kimmel, B.E; Bargmann, C.L (1997) Reprogramming Chemotaxis Responses: Sensory Neurons Define Olfactory Preferences in *C. elegans*. *Cell*. 91: 161-169.
- Tsunozaki, M; Chalasani, S.H; Bergmann, C.I (2008) A Behavioral Switch: cGMP and PKC Signaling in Olfactory Neurons Reverses Odor Preference in *C. elegans*. *Neuron*. 59: 959-971.
- Wang, Y; Chiang, A.S; Xia, S; Kitamoto, T; Tully, T; Zhong, Y (2003) Blockade of Neurotransmission in *Drosophila* Mushroom Bodies Impairs Odor Attraction, but Not Repulsion. *Current Biology*. 13: 1900-1904.
- Wintour, E.M; Alcorn, D; McFarlane, A; Moritz, K; Potocnik, S.J; Tangalakis, K (1994) Effect of maternal glucocorticoid treatment on fetal fluids in sheep at 0.4 gestation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 266: 1174-1181.
- Yamagata, N; Schmucker, M; Szyszka, P; Mizunami, M; Menzel, R (2009) Differential odor processing in two olfactory pathways in the honeybee. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 3:16.