

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
PEDECIBA**

**Tesis de maestría en Ciencias Biológicas
Subárea Zoología**

***Fenómeno de repulsión-atracción hacia los fluidos fetales
durante la gestación tardía y el parto en la oveja (*Ovis aries*)***



Lic. Edurne Lucía Cawen Errecalde

Sección Fisiología y Nutrición

Facultad de Ciencias-Universidad de la República

Orientadora:

Dra. Annabel Ferreira

Co-orientadora:

Dra. Natalia Uriarte

Tribunal:

Dra. Ana Silva

Dr. Gabriel Francescoli

Dra. Bettina Tassino

ÍNDICE

	<i>Página</i>
AGRADECIMIENTOS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Área y período de estudio	12
Animales	13
Pruebas comportamentales	14
1) <u>Prueba de preferencia en gestación tardía (comida).</u>	14
2) <u>Prueba de preferencia al parto (bolsa de agua caliente).</u>	15
Criterios de inclusión	16
Análisis de datos	16
Protocolo experimental	16
<i>Experimento 1: Evaluación de la preferencia por líquido amniótico y alantoideo.</i>	16
<i>Experimento 2: Evaluación de la actividad de diferentes sustancias biológicas.</i>	18
<i>Experimento 3: Evaluación de la actividad de las fracciones químicas obtenidas a partir de fluidos fetales.</i>	19

RESULTADOS	21
Experimento 1: Evaluación de la preferencia por líquido amniótico y alantoideo.	21
Experimento 2: Evaluación de la actividad de diferentes sustancias biológicas.	23
Experimento 3: Evaluación de la actividad de las fracciones químicas obtenidas a partir de fluidos fetales.	26
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	35
REFERENCIAS	36
ANEXO I	
Validación del modelo de bolsas para evaluar atracción durante el parto.	41
ANEXO II	
Actividades y publicaciones surgidas a partir de la presente tesis	45
Participación en proyecto de investigación financiado	45
Presentaciones en congresos	45
Publicación de artículos	45
Different chemical fractions fluids account for their attractiveness at parturition and their repulsiveness at gestation at the ewe	46

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Ana Silva, la Dra. Bettina Tassino y al Dr. Gabriel Francescoli, por haber aceptado ser parte del tribunal de esta tesis y por sus importantes aportes para mejorar este manuscrito.

A la Dra. Georgget Banchemo y a su equipo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) por sus aportes y colaboración.

Al Dr. Andrés González y sus colaboradores del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química por permitirnos realizar el fraccionamiento en sus instalaciones y ayudarnos a llevarlo a cabo.

Quisiera agradecer también al Dr. Pascal Poindron por sus invalores aportes a este trabajo así como también por su buena disposición. A Monique por su grata compañía y sus deliciosas comidas!

A Anna, Daniella, Majo, Marcela, Mayda, Nati y Valentina por el trabajo en equipo tanto en el campo como en las reuniones de discusión súper enriquecedoras.

A los colegas veterinarios, Dr. Alejandro Benech, Dr. Luis Cal, Dra. Andrea Martín, Dra. Stella Silva y Dra. Ximena Infante, por su colaboración y buena onda, las cuales hicieron que los largos y fríos días de julio y agosto en el campo de Libertad fueran mucho más llevaderos!

A Harol por toda la ayuda en el campo y sobre todo por la buena onda y por estar siempre cuidándonos a todos con mucho cariño!

Quisiera agradecer también a Anna por guiarme durante este proceso pero más que nada por su confianza en mí y por invitarme a formar parte de su extraordinario equipo de trabajo.

A Nati por el apoyo, la guía, la paciencia, y los aportes fundamentales a este trabajo y a mi formación profesional. Pero sobre todo por su calidad humana y por estar siempre!

También a mi familia y amigos por apoyarme siempre y tirarme para adelante.

A mis compañeros de trabajo por cubrirme con toda la buena onda en cada estadía que tuve en el campo y las 2.000 veces que falté por temas relacionados a la tesis.

A Mariano un agradecimiento muy especial, no sólo por sus correcciones gramaticales, sino fundamentalmente por ser el mejor compañero y seguirme con paciencia y amor durante todo este proceso. Y por redoblar la paciencia y el amor en el último trayecto!

Quisiera agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el otorgamiento de mi beca de maestría.

Y por último quisiera agradecer muy especialmente a las hermosas madres y sus corderos, a aquellas que hicieron las pruebas y también a las que no las hicieron, por compartir conmigo sus experiencias de vida y permitirme aprender de ellas!

LISTA DE ABREVIATURAS

A1: fracción acuosa 1.

A2: fracción acuosa 2.

ALA: líquido alantoideo.

CMC: carboximetilcelulosa

DCM: fracción diclorometano.

FB: fluido biológico (no específico del parto).

FF: fluidos fetales.

LA: líquido amniótico.

RESUMEN

En la oveja, los fluidos fetales (FF) se vuelven fuertemente atractivos durante el parto, promoviendo los cuidados maternos; mientras que, en otras etapas del ciclo reproductivo, son altamente repulsivos. Sin embargo, si bien la hembra se enfrenta a una mezcla de líquido amniótico (LA) y alantoideo (ALA) hasta el momento se desconoce la contribución independiente de cada uno de ellos al carácter repulsivo-atractivo de los FF. A su vez, tampoco se ha determinado el efecto de otros fluidos de origen biológico, como orina y sangre, que presentan similitudes en su composición química con los FF pero que no están relacionadas específicamente con el parto o el feto. De esta forma, el único acercamiento al conocimiento de las claves quimiosensoriales presentes en los FF consistió en ofrecer a ovejas fuera del parto fracciones obtenidas a partir del LA empleando dos solventes orgánicos, hexano y diclorometano (DCM), estudiándose únicamente el fenómeno de repulsión. En este sentido, se desconoce si las fracciones obtenidas resultan atractivas para las ovejas parturientas. Así, los objetivos de este proyecto fueron determinar la contribución independiente del LA y el ALA al carácter repulsivo-atractivo de la mezcla de FF, analizar si otros fluidos de origen biológico no específicos del parto como sangre y orina, resultan repulsivos para las hembras durante la gestación tardía y atractivos durante el parto, y establecer si las fracciones de diferente polaridad obtenidas a partir de los FF inducen por separado efectos biológicos similares a los producidos por FF fuera y dentro del período del parto.

Los fluidos empleados en las pruebas de preferencia fueron: LA y ALA extraídos de sus respectivas vesículas al parto (Experimento 1), orina y sangre proveniente de ovejas no gestantes (Experimento 2) y tres fracciones químicas (A1, A2 y DCM) obtenidas a partir del fraccionamiento de un pool de FF mediante los solventes hexano y diclorometano (Experimento 3). La repulsión se determinó mediante pruebas de preferencia empleando comida mientras que la atracción se analizó mediante un modelo de bolsas con agua tibia forradas con tela similar al pelaje del cordero.

El LA y el ALA provocaron un efecto biológico diferente en las ovejas, ya que mientras el LA fue repulsivo durante la gestación tardía, el ALA fue neutro, volviéndose atractivo durante el parto pero en menor medida que el LA. Por otro lado, tanto la orina como la sangre resultaron repulsivas para las hembras gestantes, pero únicamente la sangre despertó atracción en las ovejas durante el parto. Con respecto a las fracciones

obtenidas a partir de FF, las ovejas rechazaron durante la gestación tardía la fracción A1, mientras que las fracciones A2 y DCM, perdieron total o parcialmente el valor repulsivo. Sin embargo, todas las fracciones resultaron atractivas durante el parto.

Considerando los tres experimentos podemos concluir que al menos algunos de los compuestos responsables del fenómeno de repulsión fuera del parto son diferentes de aquellos que despiertan atracción en las hembras parturientas, los cuales podrían ser componentes generales de la sangre, pero no de la orina. En el caso de la repulsión fuera del parto, se trata compuestos de polaridad media y alta actuando sinérgicamente, mientras que durante el parto compuestos de polaridad media y alta evocan atracción actuando de forma independiente.

Más estudios serán necesarios para identificar con exactitud qué compuestos participan en los fenómenos de repulsión y atracción hacia los FF y qué otros fluidos biológicos no específicos del parto, además de la sangre, pueden estar relacionadas con este fenómeno. En este sentido, herramientas de química analítica serán fundamentales a fin de poder desentrañar la compleja mezcla de señales químicas implicadas en estos procesos.

ABSTRACT

In sheep, the FF (FF) that cover the lamb become strongly attractive for ewes, promoting maternal care whereas, during other stages of the reproductive cycle, these fluids are highly repulsive. Nonetheless, until now it is unknown the independent contribution of amniotic (AmF) and allantoids (AIF) to the repulsive-attractive character of FF for the ewes. In addition, it has not been determined yet the effect on the ewes of other biological fluids not related exclusively with parturition or the fetus, like urine or blood. In this way, the only approach to the knowledge of the chemosensory cues present in FF was to offer to non-parturient ewes fractions obtained from AmF employing two organic solvents, hexane and dichloromethane, testing repulsion. For this reason, it is unknown whether these fractions are attractive for the ewes during parturition. Accordingly, the aims of this study were to determine the independent contribution of AmF and AIF to the repulsive-attractive character of FF, analysis whether biological fluids not restricted to parturition or the fetus, like urine and blood, are repulsive during late pregnancy and attractive during parturition, and determine

whether the isolated fractions of different polarity obtained from the FF induce biological effects similar to those produced by FF during late gestation and parturition.

The fluids employed in preference tests were: AmF and AIF extracted from their respective vesicles (Experiment 1), urine and blood from non-pregnant females (Experiment 2) and three fractions (A1, A2 and DCM) obtained as the result of a FF's pool fractioned using hexane and dichloromethane solvents (Experiment 3). Ewe's repulsion or attraction towards FF and other biological substances, were determined using a two-choice test between the experimental fluid and a control substance, during late gestation and parturition. In the first case food preference tests were performed, whereas in the second one the fluids were placed on warm clothes.

AmF and AIF evoked different biological effect on the ewes, while AmF was repulsive during late pregnancy, the AIF was neutral over this instance and it becomes attractive during parturition, but in less extent that AmF. On the other side, both urine and blood were repulsive during late pregnancy, but only blood was attractive to the ewes across parturition. Concerning to the fractions, only A1 was repulsive to the ewes during late pregnancy, while A2 and DCM fractions were neutral over this instance. On the contrary, over parturition the three fractions were attractive to the ewes.

Considering the three experiments we can conclude that at least some of the compounds responsible for the phenomenon of repulsion during late pregnancy are different from those which arouse attraction in parturient females, and may be general components of blood, but not urine. The repulsion during late gestation is the result of compounds of medium and high polarity acting synergistically, whereas during parturition compounds of medium and high polarity can evoke attraction independently.

More studies are needed to identify the compounds that participate in repulsion-attraction phenomenon and other fluids not restricted to parturition, in addition to blood, which could be related to this phenomenon. In this way, chemical analysis will be crucial to clarify the complex mixture of chemical signs involved in these processes.

FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES

En mamíferos gregarios, como las ovejas, las crías son precoces al momento del nacimiento y presentan gran movilidad, por lo que la probabilidad de que crías propias se mezclen con neonatos no emparentados es alta. Por esta razón, en esta especie, la manifestación inmediata del comportamiento maternal luego del nacimiento de la cría, y el establecimiento de un vínculo selectivo entre ésta y la madre, resultan esenciales para la supervivencia del neonato. Tanto la expresión de este comportamiento, como el desarrollo del vínculo materno-filial selectivo ocurren durante un período de corta duración alrededor del parto.

En la oveja la acción sinérgica de dos factores internos permite la manifestación del comportamiento maternal en el momento del parto. Éstos son el estradiol y la estimulación vagino-cervical causada por el nacimiento del cordero. La secreción de estradiol por parte de la placenta aumenta hacia el final de la gestación, presentando con un marcado pico en las últimas 24 horas antes del parto. Por otro lado, la estimulación vagino-cervical induce una secreción periférica de oxitocina que refuerza las contracciones y una liberación central que estimula el comportamiento maternal. La secreción de estradiol en los días cercanos al parto prepara el sistema nervioso para responder de manera óptima a la estimulación vagino-cervical provocando la síntesis intracerebral de oxitocina y sus receptores (Poindron, 2005).

La acción sinérgica del estradiol y la estimulación vagino-cervical, tornan a la oveja receptiva a información sensorial proveniente del cordero. Esto cobra radical importancia ya que, si bien el inicio de la expresión del comportamiento maternal depende de la influencia de factores fisiológicos de la oveja, su mantenimiento se basa exclusivamente en la estimulación sensorial provocada por el cordero y en la experiencia que la madre obtiene en la interacción motora con el mismo (Poindron & Le Neindre, 1980). De esta forma, el control del comportamiento maternal cambia de endócrino/neuroendócrino a neurosensorial durante el período alrededor del parto (Rosenblatt *et al.*, 1979).

Este control neurosensorial de la expresión del comportamiento maternal se asocia con información olfativa presente en los fluidos fetales (FF-mezcla de líquido amniótico y alantoideo) (Lévy & Poindron, 1987). De esta forma, en la oveja al igual que en otras especies de mamíferos, los FF y la placenta representan potentes claves quimiosensoriales, jugando un rol crucial en la manifestación del comportamiento maternal durante el parto. Por esta razón, en esta especie existe una fuerte atracción

hacia los FF durante esta instancia, la cual se manifiesta por el lamido del pelaje del cordero y del suelo donde se encuentran derramados (Fig. 1a), así como hacia otros productos expulsados durante el parto, como la placenta (que se manifiesta por la placentofagia) (Collias, 1956; Lévy *et al.*, 1983, Poindron *et al.*, 2007, 2010) (Fig. 1b). Este fenómeno es temporario y extremadamente acotado, ya que fuera de este período, las hembras presentan una fuerte repulsión hacia el olor de los mismos, incluso pocos días antes del parto (gestación tardía) (Lévy *et al.*, 1983).

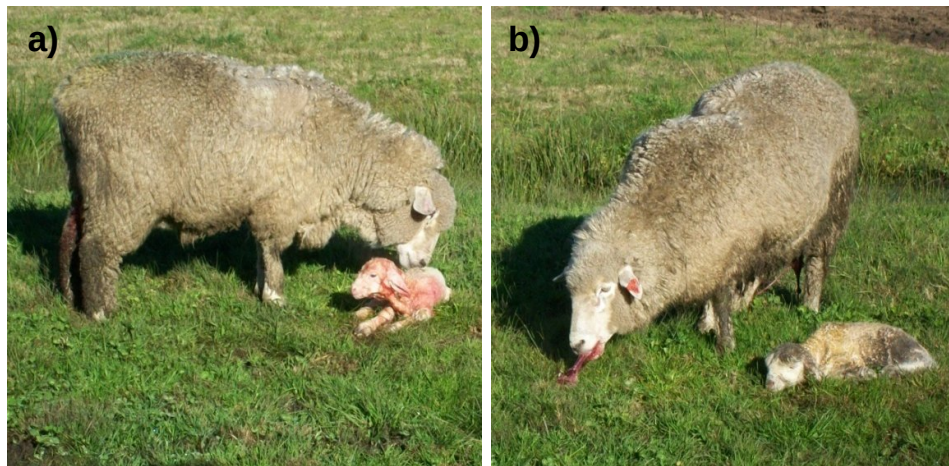


Figura 1. a) Hembra lamiendo los fluidos fetales del vellón de su cordero inmediatamente luego del parto. b) Hembra ingiriendo la placenta (placentofagia) antes de cumplida una hora postparto.

Esta atracción temporaria durante el parto facilita el establecimiento del primer contacto de la madre con su cría, mantiene a la oveja en el lugar del parto y estimula los lamidos así como los cuidados maternos y la aceptación en general (Lévy *et al.*, 1983; Poindron *et al.*, 1980). De esta forma, los FF no sólo son atractivos para la hembra sino que también refuerzan la manifestación del comportamiento maternal. Por esta razón, si se lavan los corderos, quitando los FF de su vellón, se inhibe el lamido y la aceptación maternal en ovejas postparturientas (Lévy & Poindron, 1987). Esta deficiencia en la expresión del comportamiento maternal se ve más marcada en hembras primíparas (sin experiencia maternal previa), ya que debido a su inexperiencia son más propensas a presentar dificultades al momento de desplegar correctamente la conducta maternal, mientras que las hembras multíparas (que presentan experiencia maternal) pueden tener la capacidad de compensar la pérdida de las claves olfativas presentes en los FF. En este sentido, la presencia de los FF es más crítica aún en hembras primíparas (Lévy *et al.*, 2004). El papel de los FF como promotores de la respuesta maternal también se manifiesta en ovejas que fueron

separadas de sus corderos al nacimiento, ya que éstas aceptan más rápidamente a un cordero ajeno neonato mojado en FF que a su propio cordero de 12 horas ya seco (Poindron *et al.*, 1980; Lévy & Poindron, 1983).

Por otro lado, si bien las ovejas se enfrentan a una mezcla de líquido amniótico (LA) y alantoideo (ALA) al momento del parto, estos fluidos presentan algunas diferencias en su composición, tales como iones, proteínas totales, bilirrubina, creatinina, entre otros (Morris & Barron, 1980; Ross *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1993). Sin embargo, las sustancias de excreción del feto son elementos constitutivos importantes en ambos FF, por lo que éstos presentan similitudes en la concentración de urea, sangre, nitrógeno, albúmina, estrógenos, algunos iones, y ambos derivan del plasma sanguíneo y la orina fetal (Johnson, 2007; Carnegie & Robertson, 1978; Wintour *et al.*, 1994).

A pesar de que el fenómeno de repulsión-atracción hacia los FF ha sido documentado hace varias décadas (Poindron *et al.*, 1980), hasta el momento se desconoce la naturaleza química de los compuestos presentes en los FF que provocan dicho fenómeno. Un primer acercamiento al establecimiento de su naturaleza química fue llevado a cabo por Lévy (1981). Con el fin de estudiar el fenómeno de repulsión hacia los FF, el autor realizó un fraccionamiento del LA y probó las fracciones resultantes en ovejas fuera del período del parto. La primera extracción con hexano (C_6H_{14}) permitió establecer que los compuestos responsables de la repulsión de las hembras se encontraban presentes únicamente en la fracción acuosa (acuosa 1-A1) que contenía los compuestos más polares, mientras que la que contenía moléculas apolares resultó neutra. No obstante, luego de una segunda extracción con el solvente diclorometano (CH_2Cl_2), ninguna de las cinco fracciones obtenidas resultó repulsiva para las hembras en esta instancia (Lévy, 1981). Sin embargo, el comportamiento de las ovejas frente a estas fracciones no fue evaluado durante el parto, por lo que se desconoce su relación con el carácter atractivo de los FF durante este período.

En la oveja los trastornos del vínculo materno-filial son un factor importante de mortalidad neonatal. Particularmente en hembras primíparas tras partos distócicos (partos complicados en los que es necesaria la realización de maniobras para el nacimiento del cordero) o en el caso de nacimientos múltiples. Un acercamiento al tipo de compuestos presentes en los FF que resultan atractivos para la oveja durante el parto podría contribuir a implementar procedimientos novedosos para facilitar la adopción de corderos abandonados, así como para aumentar el comportamiento de búsqueda de abrigo de las ovejas en el momento del parto. Esto podría contribuir a

disminuir la mortalidad de corderos y a reducir las pérdidas económicas que ella ocasiona a los productores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien en la actualidad el fenómeno de repulsión-atracción hacia el LA en las ovejas es bien conocido, el efecto biológico del ALA sobre las mismas, fuera y durante el parto, permanece incierto. Estudiar el comportamiento de las ovejas frente al ALA durante estas dos etapas de su ciclo reproductivo, así como comparar el comportamiento frente a este fluido con el observado hacia el LA, podría permitir determinar la contribución independiente de cada uno de estos FF al fenómeno de repulsión-atracción de los mismos en la oveja.

Por otro lado, los FF son los únicos fluidos de origen biológico frente a los cuales se ha valorado el comportamiento de las ovejas antes y durante el parto. Evaluar el comportamiento de las mismas frente a otros fluidos de origen biológico no específicos del parto, pero relacionados químicamente con los FF, como orina y sangre, podría proporcionar información en relación a la naturaleza química de los fenómenos de repulsión y atracción hacia los FF.

Finalmente, los únicos resultados con que contamos hasta el momento para acercarnos al conocimiento de las claves quimiosensoriales presentes en los FF son los presentados por Lévy (1981). Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en ovejas que se encontraban fuera del parto por lo que se estudió únicamente el fenómeno de repulsión. En este sentido, se desconoce si la fracción acuosa obtenida mediante extracción con hexano (A1), o las obtenidas a través de la subsecuente extracción con DCM resultan atractivas para las ovejas parturientas. Por esta razón, tampoco se ha podido determinar si los compuestos químicos implicados en la repulsión en ovejas fuera del parto son los responsables de la atracción en hembras parturientas o si se trata de diferentes compuestos. La comparación entre la presencia o ausencia de atracción o repulsión en ovejas parturientas y no parturientas respectivamente, proveerá información valiosa para esclarecer esta interrogante.

HIPÓTESIS

1. Dado que los FF que recubren al cordero resultan altamente repulsivos para las ovejas no parturientas y fuertemente atractivos durante el período del parto, postulamos que sus constituyentes, el LA y el ALA por separado inducirán repulsión fuera y atracción dentro del período del parto.
2. En base a que la sangre y la orina son fluidos biológicos (FB) constituyentes de los FF y al hecho de que las ovejas parturientas muestran una fuerte atracción a lamer e ingerir la placenta, se plantea la hipótesis de que estos fluidos inducirán el mismo efecto biológico que los FF en las ovejas fuera y durante el parto.
3. Dado que la fracción de LA que contiene los compuestos de polaridad media y alta, resulta repulsiva fuera del parto, se postula que la fracción A1 de los FF se comportará en forma similar durante la gestación tardía y será atractiva para las ovejas parturientas. De forma similar, se espera que la separación de los componentes de polaridad media y alta, elimine la repulsión y atracción fuera y dentro del parto respectivamente.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Determinar la contribución independiente de los LA y ALA al carácter repulsivo-atractivo de la mezcla de fluidos fetales durante la gestación tardía y el parto.
2. Determinar si fluidos de origen biológico no específicos del parto, como sangre y orina, resultan repulsivos para las hembras durante la gestación tardía y atractivos en el momento del parto.
3. Determinar si las fracciones de diferente polaridad obtenidas a partir de los FF inducen por separado efectos biológicos similares a los producidos por FF fuera y dentro del período del parto.

Objetivos específicos

1. Determinar el comportamiento de ovejas multíparas hacia el LA y el ALA puros durante la gestación tardía (día 145 de gestación) en el modelo de preferencia por alimento y durante el parto (de tres horas antes del nacimiento del cordero a diez minutos después del mismo) en el modelo de preferencia por bolsas.
2. Determinar el comportamiento de ovejas multíparas hacia orina y sangre durante la gestación tardía (día 145 de gestación) en el modelo de preferencia por alimento y durante el parto (de tres horas antes del nacimiento del cordero a diez minutos después del mismo) en el modelo de preferencia por bolsas.
3. Determinar el comportamiento de ovejas multíparas hacia las fracciones A1, obtenida luego del fraccionamiento de los FF con hexano, y hacia A2 y DCM producto del fraccionamiento de A1 con el solvente diclorometano, durante la gestación tardía (día 145 de gestación) en el modelo de preferencia por alimento y durante el parto (de tres horas antes del nacimiento del cordero a diez minutos después del mismo) en el modelo de preferencia por bolsas.
4. Validar el modelo de preferencia por bolsas para evaluar la atracción por diferentes sustancias durante el parto sin emplear alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de tesis se llevo a cabo en el marco del 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”, responsable: Dra. Annabel Ferreira.

Área y período de estudio

Durante el año 2009 el trabajo de campo se realizó en la estación experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, ubicada en el departamento de Colonia (34° 19' 57" S, 57° 40' 6" W). A partir del año 2010 y hasta la

finalización del proyecto, el trabajo de campo se llevó a cabo en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República), ubicado en el departamento de San José (34° 40' 32" S, 56° 32' 14" W).

Animales

Se utilizaron ovejas (*Ovis aries*) multíparas de la raza Ideal (Estanzuela) y Corriedale (Campo Experimental N°2) (se seleccionaron hembras multíparas a fin de estandarizar la experiencia maternal de los individuos empleados). Las ovejas se identificaron mediante numeración pintada en el vellón y caravanas numeradas en las orejas. Los celos se sincronizaron con esponjas de progesterona (Sintex®) seguido de inyección de PMSG (250 UI, im, Novormon®) al momento de retirar las esponjas. Luego se realizó la monta natural con carneros seleccionados y marcados, registrándose la fecha de la misma. La encarnera (monta) se efectuó en lotes escalonados de manera de obtener partos durante un período extenso. Los partos se sincronizaron a través de la administración de 15 mg de dexametasona (2.0 mg/ml, im, Disperdex, Dispert, Montevideo) en el día 144 de gestación. Este fármaco induce el parto a partir de 36 horas luego de su administración, sin afectar el establecimiento del comportamiento maternal (Poindron & Le Neindre, 1980). Se contó con la asistencia de veterinarios en ambos establecimientos.

Los animales se encontraban a campo abierto con acceso a alfalfa y ración para complementar su alimentación. Una semana antes de la inyección de dexametasona se comenzó a habituar a las hembras a los bretes en los cuales se llevarían a cabo las pruebas. Con este fin se introdujo a las hembras individualmente en bretes de 2,0x2,0 m en los cuales se les ofreció el alimento (pellet de maíz en este caso) *ad libitum* en dos recipientes idénticos espaciados 10 cm uno del otro. Este procedimiento se realizó durante tres horas diariamente hasta la inyección de dexametasona. A partir de este momento, las hembras permanecieron en los bretes hasta finalizadas las pruebas. Todas las ovejas pasaron por este procedimiento, si bien los datos analizados corresponden a animales diferentes para la gestación tardía y el parto.

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

Pruebas comportamentales

Para evaluar la repulsión y atracción de las ovejas se realizaron dos tipos de pruebas de preferencia, ambas con dos estímulos, uno correspondiente a la sustancia experimental y el otro a la sustancia control. Todas las pruebas tuvieron una duración de tres minutos y el registro de los datos se efectuó de forma continua mediante la técnica de muestreo animal-focal (Martin & Bateson, 1991). Las hembras se encontraban separadas individualmente en los bretes al momento de las pruebas.

1) Prueba de preferencia en gestación tardía (comida)

Debido al carácter repulsivo de los FF para la oveja fuera del período crítico alrededor del parto, resultó necesario emplear un estímulo positivo que provocara el interés de las hembras y su acercamiento a los recipientes conteniendo la sustancia experimental a fin de evaluar su comportamiento frente a ésta. Por este motivo, se empleó el modelo con comida propuesto por Lévy y colaboradores en 1983. Este modelo permite evaluar si una sustancia es repulsiva, ya que en caso de serlo los animales evitarían alimentarse del recipiente que la contiene aún estando hambrientos (Lévy *et al.*, 1983).

Las pruebas efectuadas fuera del parto se realizaron en el día 145 de gestación (gestación tardía). Dos horas antes de realizar la prueba se retiró el agua y el alimento a fin de estandarizar el estado fisiológico de las hembras y aumentar su apetito, incentivando su interés por el alimento ofrecido durante las pruebas, a cuya ingestión estaban acostumbradas (ración).

La prueba consistió en exponer a las hembras a dos recipientes con ración separados entre sí por un espacio de 10 cm, uno humedecido con el fluido o fracción a estudiar y el otro con la sustancia control. Ambas sustancias se encontraban a una temperatura similar a la corporal (39°C). La prueba comenzó cuando la hembra acercó el hocico a menos de 5 cm de la comida contenida en alguno de los recipientes. Se registró el tiempo de consumo y cantidad ingerida (masa en gramos) para cada recipiente (calculada como la diferencia entre el alimento inicial ofrecido en gramos y el alimento no consumido) (Fig. 2a). Luego de las pruebas los recipientes fueron cuidadosamente lavados y secados, y fueron utilizados varias series de recipientes a fin de evitar la contaminación quimiosensorial entre diferentes sustancias.

Las variables empleadas para el análisis fueron latencia a comer de cada recipiente (tiempo transcurrido desde el comienzo de la prueba hasta que comienza a alimentarse), porcentaje de alimento ingerido para cada recipiente (alimento ingerido

de un recipiente con respecto al total ingerido de ambos recipientes) y tiempo total de ingesta de ración para cada recipiente.

2) Prueba de preferencia en el parto (bolsa de agua caliente)

Durante el parto se empleó el modelo de bolsas, el cual fue previamente validado (ver Anexo I). El propósito del mismo fue evaluar la atracción hacia las sustancias a probar en sí mismas sin la existencia de otro estímulo positivo reforzador como la comida, que pudiera enmascarar la atracción hacia estas sustancias, no permitiendo establecer si ésta es atractiva o neutra.

Las pruebas al parto se realizaron una vez que se rompía el saco amniótico, o se visualizaban las pezuñas del cordero en la vulva de la hembra o inmediatamente después de la expulsión fetal. En este último caso, el neonato se retiraba inmediatamente después del parto impidiendo el contacto madre-cría antes de las pruebas. Una vez concluidas las pruebas, los corderos fueron devueltos a sus madres, procedimiento que no afectó el establecimiento del vínculo materno-filial.

Antes de efectuar las pruebas se colocó un recipiente con FF frente al hocico de la oveja para evaluar la atracción de las hembras hacia éstos mediante el lamido de los mismos.

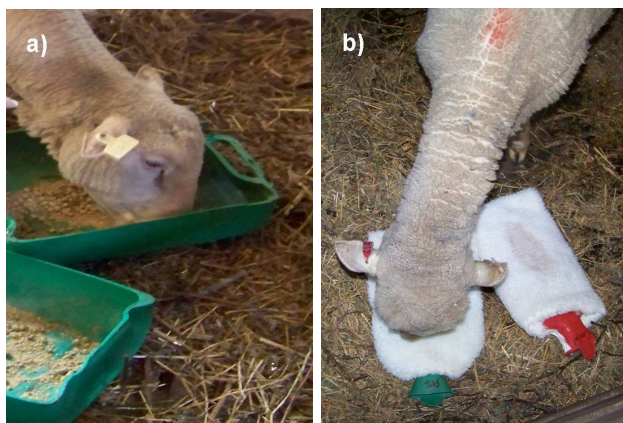


Figura 2. a) Pruebas realizadas durante la gestación tardía para evaluar la preferencia de las ovejas por comida humedecida con la fracción o fluido a estudiar o por control, b) Pruebas realizadas durante el parto con bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecidas con la fracción o fluido a estudiar o con la sustancia control, a fin de evaluar la preferencia de las hembras por las mismas.

El modelo de bolsas consistió en ofrecer a la hembra dos bolsas de goma conteniendo agua a una temperatura aproximada a la corporal del cordero (39°C

aproximadamente) y forradas con tela similar al pelaje del mismo. Una de las bolsas presentaba la tela humedecida con el fluido o fracción a estudiar y la otra con la sustancia control, situadas a 10 cm de distancia entre sí. La prueba comenzó cuando la hembra acercó su hocico a menos de 5 cm de alguna de las bolsas (Fig. 2b). De forma similar a las pruebas en gestación tardía, las bolsas eran cuidadosamente limpiadas, se cambiaba la tela que las recubría y fueron empleadas varias series de bolsas a fin de evitar la contaminación quimiosensorial entre diferentes sustancias.

Las variables empleadas para el análisis fueron latencia a lamer (tiempo transcurrido desde el comienzo de la prueba hasta que lame la bolsa) y tiempo total de lamido para cada bolsa.

Criterios de inclusión

En gestación tardía fueron incluidas dentro del estudio únicamente aquellas pruebas en las cuales las hembras se alimentaron durante más de cinco segundos ingiriendo más del 5% del alimento ofrecido, en el caso de las pruebas en el parto el criterio de inclusión fue que la hembra olfateara al menos una vez una de las bolsas que se le presentaban.

Análisis de datos

Dado que los datos no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica (normalidad y homogeneidad de varianza), se utilizaron pruebas no paramétricas para su análisis. Se empleó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de grupos independientes y los test de Wilcoxon y Friedman para el caso de dos o más de dos grupos dependientes, respectivamente (Siegel, 1956; Sokal & Rolf, 1979). Los datos se expresan en mediana (desvío de la mediana absoluta – MAD: mediana de las diferencias absolutas entre cada dato y la mediana de los datos). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 7.0 y el nivel de significación seleccionado fue del 5% (Sokal & Rolf, 1979).

Protocolo experimental

Experimento 1: Evaluación de la preferencia por líquido amniótico y alantoideo.

1) Recolección de líquido amniótico y alantoideo.

Con el fin de conocer la contribución independiente del LA y el ALA al carácter repulsivo-atractivo de los FF, se realizaron pruebas utilizando ambos FF puros y por separado, cada uno contra un control. Como control se empleó una solución de

carboximetilcelulosa (CMC) al 2%. Este compuesto fue empleado como control ya que se ha observado que, en combinación con el agua, es de olor y sabor neutro para la oveja y de viscosidad similar a la de los FF.

Los FF se colectaron directamente de las vesículas expulsadas por las hembras durante el parto. La identificación de las mismas fue sencilla, ya que la vesícula alantoidea es generalmente la primera en ser expulsada y el ALA es de coloración marrón y baja viscosidad (Fig. 3) (Jainudeen *et al.*, 2002). Por otro lado, el LA es de coloración amarillenta y alta viscosidad (Fig. 3).

Una vez que las vesículas fueron visualizadas, se perforaron y su contenido se recolectó directamente en recipientes de almacenamiento limpios, uno para cada FF. De esta forma, se generó un pool a proveniente de varias hembras para cada uno de los FF, lo que permitió estudiar el comportamiento de las ovejas en base a compuestos característicos de los FF eliminando posibles señales individuales. Ambos recipientes se mantuvieron refrigerados hasta la realización de las pruebas, momento en el cual su contenido fue calentado hasta alcanzar la temperatura corporal del cordero (39°C). Para calentarlos se sumergieron los recipientes que los contenían dentro de otro con agua caliente, procedimiento que no afecta las características químicas de los FF (Andrés González, com. pers.).



Figura 3. Líquido alantoideo (ALA-izquierda) y líquido amniótico (LA-derecha) obtenidos al momento del parto a través de la punción de las vesículas alantoidea y amniótica respectivamente. Cada uno de estos FF fueron empleados en las pruebas de preferencia realizadas durante la gestación tardía y el parto.

2) Registro de datos

En cada individuo se probaron los dos FF contra un control, empleándose para ello un diseño contrabalanceado. Las pruebas se realizaron con un intervalo de tres minutos entre ellas. Durante la gestación tardía y el parto se emplearon individuos diferentes. En el primer caso se realizaron pruebas con comida (40 gramos de ración humedecida con 20 ml de FF o control), mientras que en el segundo caso se emplearon bolsas forradas con tela mojada (10 ml de FF o control).

Experimento 2: Evaluación de la actividad de diferentes fluidos biológicos no específicos del parto.

1) Obtención de los fluidos biológicos

Para realizar otro acercamiento al tipo de compuestos presentes en los FF que proporcionan el carácter repulsivo-atractivo de los mismos y considerando que ambos derivan del plasma sanguíneo y la orina fetal, se realizaron pruebas de preferencia durante la gestación tardía y el parto, empleando sangre y orina contra un control (solución de CMC). Ambos FB fueron extraídos de hembras adultas vacías (no gestantes) por investigadores entrenados (Dr. Alejandro Benech y Dr. Luis Cal). Se extrajo 20 ml de sangre por oveja mediante punción yugular y se conservó con heparina (0,5 ml por cada 20 ml de sangre), mientras que para la recolección de la orina (20 ml por oveja) se utilizó el método de apnea, que consiste en tapar el hocico del animal generando el reflejo de micción. Se realizó la extracción de ambos fluidos a 10 individuos, generándose un pool para cada uno de ellos, los cuales se mantuvieron refrigerados hasta el momento de las pruebas, momento en el cual fueron entibiados a una temperatura aproximada de 39°C.

2) Registro de datos

En este caso se empleó un diseño independiente (diferentes hembras fueron probadas para cada sustancia tanto en gestación tardía como al momento del parto) ya que la sangre podría resultar muy aversiva e interferir en el comportamiento de las hembras, afectando el resultado de la siguiente prueba. En gestación tardía se realizaron pruebas con comida (40 gramos de ración mojada con 10 ml de sustancia), mientras que durante el parto se emplearon bolsas forradas con tela humedecida (10 ml de sustancia).

Experimento 3: Evaluación de la actividad de las fracciones químicas obtenidas a partir de fluidos fetales.

1) Recolección de fluidos fetales

El método de recolección fue similar al utilizado en el Experimento 1 con la diferencia de que los dos fluidos fueron recolectados en el mismo recipiente. Se generó así un pool a partir de FF de varias hembras el cual fue sometido a un fraccionamiento químico. El fraccionamiento se realizó sobre una mezcla de ambos FF porque en la naturaleza la hembra se enfrenta a una mezcla de FF en lugar de hacerlo a cada uno de ellos puros y por separado.

2) Fraccionamiento químico

El fraccionamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Química del Departamento de Química Orgánica, perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad de la República, a cargo del Dr. Andrés González.

Se realizó un fraccionamiento empleando dos solventes orgánicos en el siguiente orden: 1-hexano y 2-diclorometano (ambos altamente volátiles). El hexano (C_6H_{14}) es un solvente orgánico apolar, con densidad inferior a la del agua, que se emplea en la extracción de moléculas liposolubles, como grasas e hidrocarburos. Por otro lado, el diclorometano (CH_2Cl_2) es un solvente orgánico más polar que el hexano, el cual permite extraer moléculas de polaridad media, tales como los esteroides.

Primer fraccionamiento con hexano

El pool de FF obtenido (5,5 litros) se filtró a través de una gasa para eliminar las impurezas gruesas (meconio, restos de tejidos, etc.) y posteriormente se centrifugó a una temperatura de 4°C durante 20 minutos a 5000 rpm, a fin de separar sus componentes celulares. El filtrado obtenido se colocó en una ampolla de decantación con hexano. El solvente se incorporó a razón de 0,5 litros por cada 2 litros de fluidos fetales de manera gradual, empleándose en total 1,5 litros de solvente a fin de lograr la separación de fases. A partir de esta primera extracción se obtuvieron dos fracciones: una que contenía el solvente (fracción hexano, con un volumen de 0,950 litros) y otra acuosa (A1, con un volumen de 4 litros), y una emulsión que fue descartada tras ser sometida a distintos métodos con el fin de separarla (centrifugado, calor y agregado de sal) sin éxito.

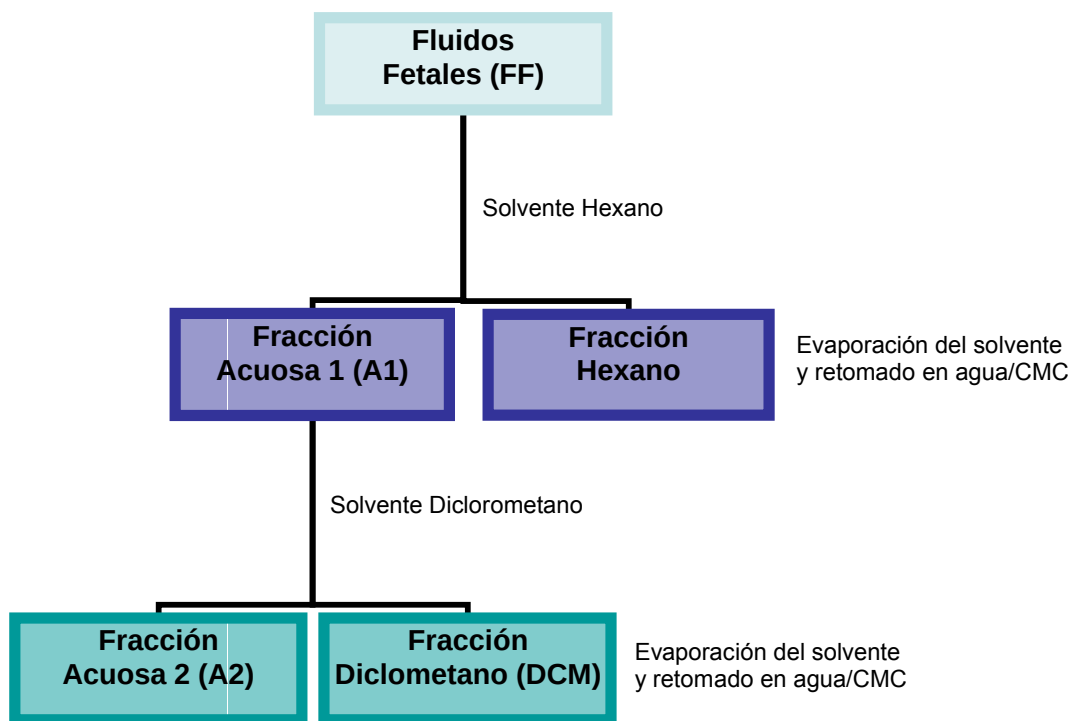


Figura 4. Esquema del fraccionamiento químico realizado a los fluidos fetales (FF) para la obtención de las fracciones biológicas empleadas en las pruebas comportamentales del Experimento 1.

La fracción hexano obtenida fue colocada en un rotavapor (evaporador rotatorio) a fin de producir la evaporación del solvente, ya que este solvente presenta un olor penetrante que podría interferir en las pruebas comportamentales. La masa sólida obtenida mediante este proceso fue muy escasa (0,6 gramos), por lo que no fue empleada en este experimento.

La fracción A1 se separó en dos partes iguales. A una de éstas (2 litros) se le agregó CMC (por las propiedades de ésta anteriormente mencionadas). La otra mitad se usó para la realización de un segundo fraccionamiento empleando diclorometano (Fig. 4).

Segundo fraccionamiento con diclorometano

Parte de la fase acuosa obtenida en el paso anterior (2 litros) se fraccionó con diclorometano. El procedimiento de extracción fue el mismo que el descrito en el experimento anterior, obteniéndose una fracción que contenía el solvente y su fracción acuosa (fracción DCM y A2, respectivamente).

La fracción que contenía el solvente se secó mediante el mismo proceso que la fracción hexano del experimento anterior, y el residuo sólido obtenido fue retomado en agua hasta alcanzar el volumen que tenía la fracción al ser introducida en el rotavapor

(1 litro aproximadamente). Tanto a la fracción DCM obtenida mediante este procedimiento así como a la fracción A2 obtenida previamente (1 litro aproximadamente) se le agregó CMC (Fig. 4).

A fin de ser utilizados como control ambos solventes (hexano y diclorometano) fueron secados y retomados en agua hasta alcanzar el volumen aproximado de las fracciones A1, A2 y DCM (1 litro) y se les agregó CMC. El control con hexano se empleó para el caso de la fracción A1, mientras que el control con diclorometano se empleó para las fracciones A2 y DCM.

3) Registro de datos

Mediante un diseño contrabalanceado las tres fracciones obtenidas se testearon en cada individuo. Las pruebas efectuadas en gestación tardía se realizaron en individuos diferentes a los del parto. Al igual que en los experimentos anteriores en gestación tardía se realizaron pruebas con comida (40 gramos de ración humedecida con 20 ml de fracción o control), mientras que durante el parto se emplearon bolsas forradas con tela humedecida (10 ml de fracción o control).

RESULTADOS

Experimento 1: Evaluación de la preferencia por líquido amniótico y alantoideo.

Gestación tardía

De las once ovejas preñadas que fueron probadas, tres fueron excluidas por no mostrar interés en las pruebas, obteniéndose ocho hembras para el análisis.

La latencia a comer ración humedecida con LA no difirió de la de su control ($T_{(N=8)}=7,0$, $p=0,12$, Tabla 1). Sin embargo, las hembras comieron menos ración humedecida con LA que con control (% de alimento ingerido: LA: 15,9 (15,9) vs control: 84,1 (15,9), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,012$, Fig. 5a), empleando para ello un tiempo menor al empleado en la ingesta de ración con solución de CMC (LA: 8,0 (8,0) vs control: 75,5 (36,0), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,012$, Fig. 5b).

En el caso del ALA, el comportamiento de las ovejas no mostró diferencias en cuanto a la latencia a alimentarse del recipiente conteniendo ración humedecida con este fluido o con control ($T_{(N=8)}=10,0$, $p=0,26$, Tabla1), como tampoco en la cantidad de

alimento ingerido (ALA: 42,6 (23,1) vs control: 41,8 (34,2), $T_{(N=8)}=16,0$, $p=0,78$, Fig. 5a), o en el tiempo de alimentación (ALA: 39,5 (21,5) vs control: 81,5 (13,0), $T_{(N=8)}=8,0$, $p=0,31$, Fig. 5b).

La latencia a comer no difirió entre ambos FF (Tabla 1), sin embargo, tanto el porcentaje de alimento ingerido ($T_{(N=8)}=4,0$, $p=0,05$) (Fig. 5a), como el tiempo total de alimentación fueron significativamente menores para el LA que para el ALA ($T_{(N=8)}=2,0$, $p=0,025$) (Fig. 5b).

Tabla 1. Latencia a comer ración humedecida con fluidos fetales (FF) o con control durante la gestación tardía.

<i>Latencia (s)</i>	<i>Control</i>	<i>FF</i>
LA	7,5 (7,0)	55,0 (31,5)
ALA	4,5 (2,5)	61,0 (53,0)
T	11,0	15,0
P	0,61	0,67

Los datos se expresan en medianas (MAD), test de Wilcoxon para muestras pareadas.

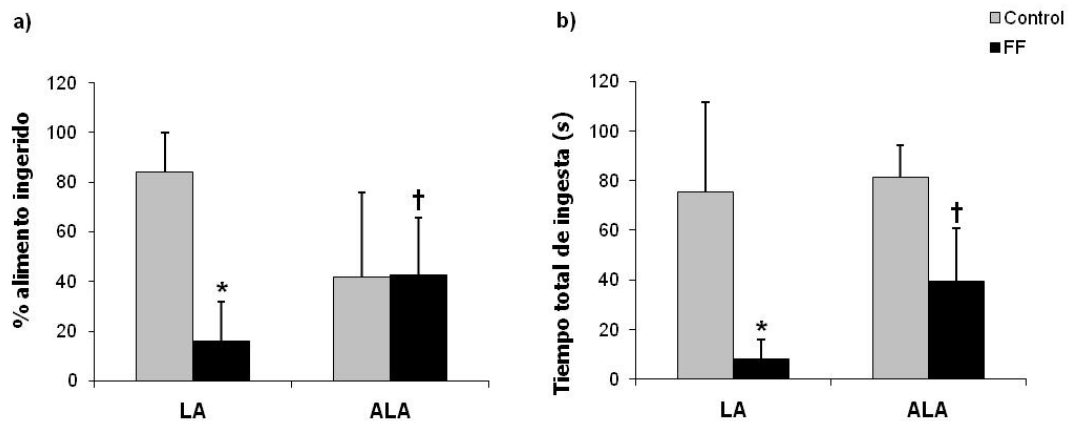


Figura 5. Pruebas de preferencia realizadas durante la gestación tardía para evaluar repulsión empleando comida humedecida con el fluido fetal (FF) a estudiar o con control. a) Porcentaje de consumo de ración humedecida con LA o ALA y sus controles con respecto al total de alimento ingerido en cada prueba, b) Tiempo total de ingesta de ración humedecida con LA o ALA y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas. * $p \leq 0,05$ respecto a su control, † $p \leq 0,05$ respecto a LA.

Parto

Durante el parto, se emplearon once hembras que cumplieron el criterio de inclusión. Para ambos FF las hembras demoraron menos tiempo en lamer las bolsas humedecidas con los mismos, ignorando las de sus respectivos controles (LA: 4,0 (3,0) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,003$ y ALA: 3,0 (2,0) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,005$), sin hallarse diferencias significativas entre ambos FF ($T_{(N=11)}=16,0$, $p=0,78$) (Fig. 6a).

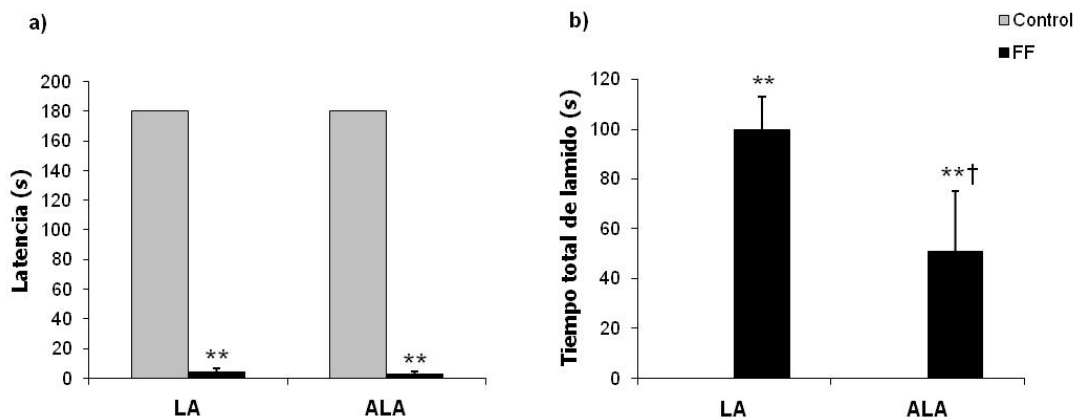


Figura 6. Pruebas de preferencia realizadas durante el parto para evaluar atracción empleando bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecidas con el fluido fetal (FF) a estudiar o con control. a) Latencia a lamer bolsa humedecida con LA o ALA y sus controles, b) Tiempo total de lamido para cada bolsa humedecida con LA o ALA y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas. ** $p \leq 0,01$ respecto a control, † $p \leq 0,05$ respecto a LA.

Asimismo, las ovejas lamieron la tela de las bolsas con FF durante más tiempo que la de sus respectivos controles (LA: 100,0 (13,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,003$ y ALA: 51,0 (24,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,005$). Sin embargo, el tiempo de lamido del LA fue mayor al del ALA ($T_{(N=11)}=11,0$, $p=0,05$) (Fig. 6b).

Experimento 2: Evaluación de la actividad de diferentes fluidos biológicos no específicos del parto.

Gestación tardía

Para evaluar el comportamiento de las hembras gestantes frente a orina se sometió a doce hembras a la prueba de comida con orina, de las cuales dos fueron excluidas por no mostrar interés en las pruebas, obteniéndose diez hembras para el análisis. Por otro lado, para la prueba con sangre se emplearon once ovejas (diferentes a las

empleadas en la prueba con orina), de las cuales ocho cumplieron con el criterio de inclusión y fueron consideradas en el análisis.

Las hembras demoraron más tiempo en comenzar a comer ración humedecida con orina respecto a la sustancia control ($T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,005$, Tabla 2). Por otro lado, consumieron menos alimento (% alimento ingerido: orina: 0,0 (0,0) vs control: 100,0 (0,0), $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,005$, Fig. 7a), y se alimentaron menos tiempo de ración humedecida con orina que con control (orina: 0,0 (0,0) vs control: 150,0 (49,0), $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,005$, Fig. 7b).

Tabla 2. Latencia a comer ración humedecida con FB o con control durante la gestación tardía.

<i>Latencia (s)</i>	<i>Control</i>	<i>FB</i>
<i>Orina</i>	<i>3,5 (2,5)</i>	<i>180,0 (0,0)**</i>
<i>Sangre</i>	<i>8,0 (4,0)</i>	<i>180,0 (0,0)*</i>
<i>U</i>	<i>39,0</i>	<i>24,0</i>
<i>P</i>	<i>0,93</i>	<i>0,051</i>

Los datos se expresan en medianas (MAD), * $p<0,05$, ** $p<0,01$ fluidos biológicos vs controles, tests de Wilcoxon para muestras pareadas y Mann-Whitney para muestras independientes.

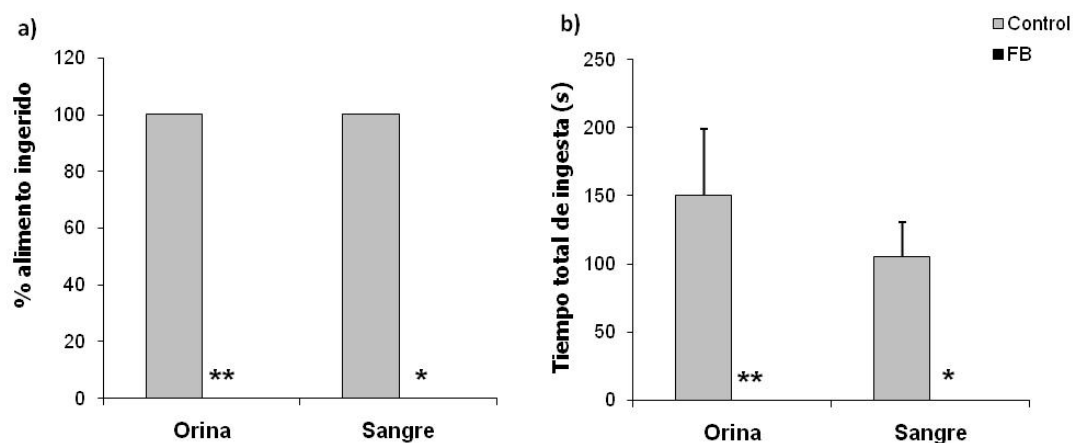


Figura 7. Pruebas de preferencia realizadas durante la gestación tardía para evaluar repulsión empleando comida humedecida con el fluido biológico (FB) a estudiar o con control. a) Porcentaje de consumo de ración humedecida con orina o sangre y sus controles con respecto al total de alimento ingerido para cada prueba, b) Tiempo total de ingesta de ración mojada con orina o sangre y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas y Mann-Whitney para muestras independientes. No se hallaron diferencias significativas entre los dos FB. * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$ respecto al control.

En referencia a la sangre, las ovejas nunca se alimentaron de la ración que la contenía. Por esta razón, la latencia a comer ración humedecida con este fluido fue mayor que para su control ($T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,012$, Tabla 2). Asimismo, la cantidad de ración humedecida con sangre ingerida por las ovejas (sangre: 0,0 (0,0) vs control: 100,0 (0,0), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,012$, Fig. 7a), así como el tiempo que emplearon en su ingesta fueron inferiores al control (sangre: 0,0 (0,0) vs control: 105,5 (25,5), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,012$, Fig. 7b).

Sin embargo, si bien el tiempo total alimentándose no difirió significativamente entre ambos FB ($U=28,0$, $p=0,10$, Fig. 7b), la latencia (Tabla 2) y el porcentaje de alimento ingerido ($U=24,0$, $p=0,051$, Fig. 7a) mostraron una tendencia a diferir entre ambos fluidos. Esto se debe a que si bien ninguna oveja se alimentó de la ración conteniendo sangre, tres animales lo hicieron de la ración humedecida con orina.

Parto

Durante el parto se evaluó la atracción hacia sangre y orina en diferentes ovejas. Para ambos FB se emplearon ocho ovejas en el análisis, tras descartarse únicamente una hembra en la prueba con sangre por no cumplir el criterio de inclusión.

Las ovejas demoraron menos tiempo en comenzar a lamer las bolsas humedecidas con sangre, ya que nunca lamieron las bolsas con control (sangre: 51,0 (49,5) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,028$), ni con orina ($U=14,0$, $p=0,04$). En este sentido, la orina no mostró diferencias significativas con respecto a su control, pues las hembras tampoco lamieron las bolsas humedecidas con esta sustancia (orina: 180,0 (0,0) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,11$) (Fig. 8a).

Asimismo, el tiempo total que las ovejas emplearon en lamer la tela humedecida con sangre fue mayor con respecto a su control (sangre: 31,5 (31,5) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=8)}=0,0$, $p=0,028$) y a la orina ($U=12,5$, $p=0,029$), la cual no difirió significativamente de la sustancia control (orina: 0,0 (0,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=8)}=2,0$, $p=0,59$) (Fig. 8b).

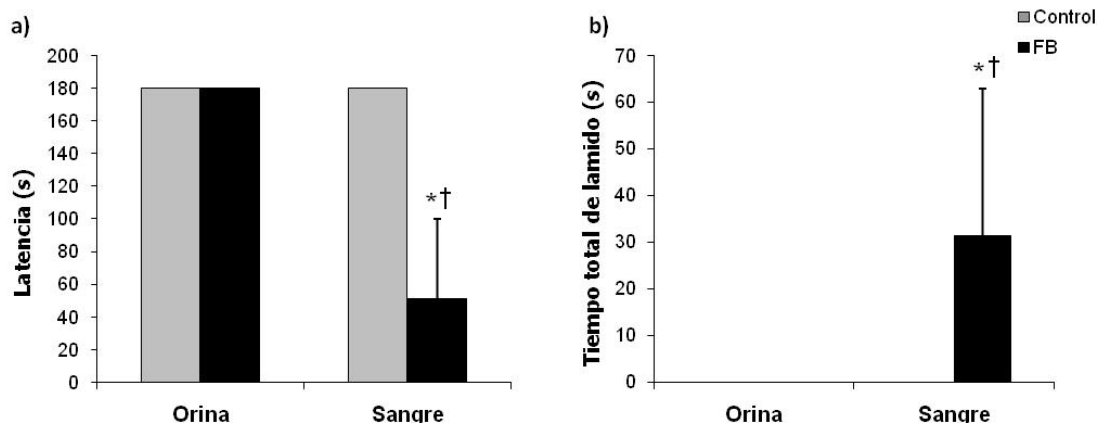


Figura 8. Pruebas de preferencia realizadas durante el parto para evaluar atracción empleando bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecidas con el fluido biológico (FB) a estudiar o con control. a) Latencia a lamer bolsa humedecida con orina o sangre y sus controles, b) Tiempo total de lamido para cada bolsa humedecida con orina o sangre y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizaron los test de Wilcoxon para muestras pareadas y Mann-Whitney para muestras independientes. * $p \leq 0,05$ respecto a control, † $p \leq 0,05$ respecto a orina.

Experimento 3: Evaluación de la actividad de las fracciones químicas obtenidas a partir de fluidos fetales.

Gestación tardía

Trece de dieciocho ovejas cumplieron con el criterio de inclusión y fueron evaluadas en las pruebas de preferencia.

Las ovejas gestantes mostraron una mayor latencia a comer alimento humedecido con la fracción A1 respecto al humedecido con control ($T_{(N=13)} = 4,0$, $p = 0,004$; Tabla 3). Por otro lado, tanto la cantidad de ración humedecida con dicha fracción que consumieron (% de alimento ingerido: A1: 6,3 (6,3) vs control: 93,8 (6,2), $T_{(N=13)} = 0,0$, $p = 0,003$, Fig. 9a), como el tiempo total en que se alimentaron de ésta, fueron significativamente menores en relación al control (A1: 2,0 (2,0) vs control: 66,0 (15,0), $T_{(N=13)} = 6,0$, $p = 0,006$, Fig. 9b).

Por el contrario, el comportamiento de las hembras frente a la comida humedecida con la fracción A2 no difirió del observado frente al control con respecto a la latencia a comer ($T_{(N=13)} = 38,0$, $p = 0,6$, Tabla 3), ni tampoco a la cantidad de alimento ingerido (% alimento ingerido: DCM A2: 50,0 (0,8) vs control: 50,0 (0,8), $T_{(N=13)} = 16,5$, $p = 0,48$, Fig. 9a), o al tiempo en que se alimentaron (A2: 45,0 (17,1) vs control: 52,0 (13,0), $T_{(N=13)} = 28,0$, $p = 0,39$, Fig. 9b).

Con respecto a la fracción DCM, las ovejas demoraron más tiempo en comenzar a alimentarse de la ración humedecida con dicha fracción que con la sustancia control ($T_{(N=13)} = 14,5$, $p=0,03$; Tabla 3). A su vez, las hembras mostraron una tendencia a consumir menos ración humedecida con esta fracción que con control (% alimento ingerido: DCM: 34,5 (17,1) vs control: 65,5 (17,1), $T_{(N=13)}=13,0$, $p=0,08$, Fig. 9a). Sin embargo, el tiempo en que se alimentaron de cada recipiente no difirió entre la fracción y su control (DCM: 16,7 (14,4) vs control: 25,6 (11,6), $T_{(N=13)}=26,0$, $p=0,17$, Fig. 9b).

Tabla 3. Latencia a comer ración humedecida con fracción o con control durante la gestación tardía.

<i>Latencia (s)</i>	<i>Control</i>	<i>Fracción</i>
A1	3,0 (2,0)	146,0 (34,0)**
A2	10,0 (10,0)	34,0 (32,0)
DCM	3,0 (2,0)	56,0 (25,0)*
F_r	2,21	3,24
P	0,33	0,20

Los datos se expresan en medianas (MAD), * $p<0,05$, ** $p<0,01$ fracciones vs controles, test de Wilcoxon para muestras pareadas.

Con respecto al análisis comparativo de las 3 fracciones, el comportamiento de las ovejas no mostró diferencias entre éstas en relación a la latencia a comer (Tabla 3). Por el contrario, la cantidad de alimento ingerido por las ovejas difirió entre las 3 fracciones ($Fr_{(N=13, df=2)}=10,29$, $p=0,006$, Fig. 9a). Éstas prefirieron alimentarse de ración humedecida con A2 ($T_{(N=13)}=1,0$, $p=0,004$) o con DCM ($T_{(N=13)}=4,0$, $p=0,028$) que con A1. No se hallaron diferencias con respecto al consumo entre A2 y DCM ($T_{(N=13)}=13,0$, $p=0,14$). El tiempo que emplearon las ovejas en alimentarse también presentó diferencias entre las tres fracciones ($Fr_{(N=13, df=2)}=6,78$, $p=0,034$, Fig. 9b), las cuales se hallaron nuevamente entre la fracción A1 y A2 ($T_{(N=13)}=3,5$, $p=0,005$), no hallándose diferencias entre DCM y las otras dos fracciones ($T_{(N=13)}=11,0$, $p=0,09$, $T_{(N=13)}=28,0$, $p=0,38$, A1 y A2 respectivamente).

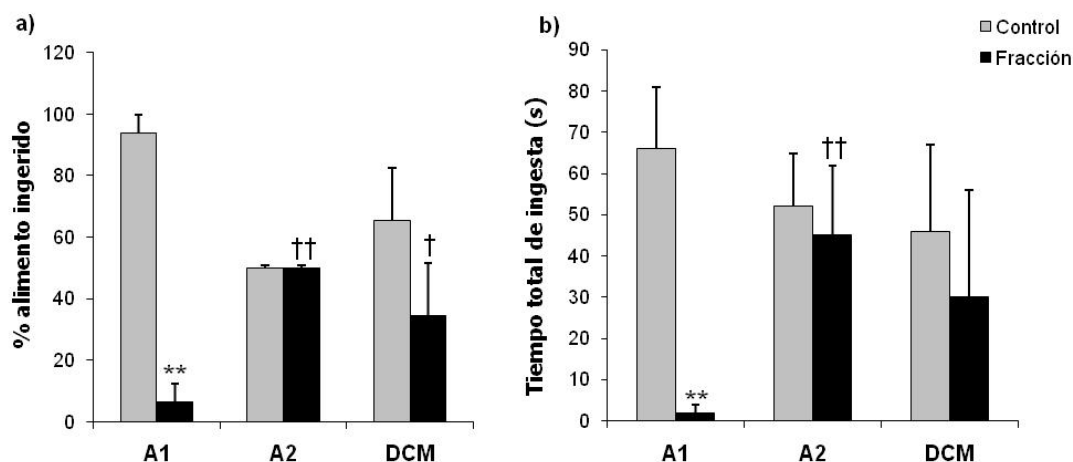


Figura 9. Pruebas de preferencia realizadas durante la gestación tardía para evaluar repulsión empleando comida humedecida con la fracción a estudiar o con control. a) Porcentaje de consumo de ración humedecida con las fracciones A1, A2 o DCM y sus controles con respecto al total de alimento ingerido para cada prueba, b) Tiempo total de ingesta de ración mojada las fracciones A1, A2 o DCM y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizaron los tests de Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas. ** $p \leq 0,01$ respecto a control de A1, † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,01$ respecto a A1.

Parto

Durante el parto se evaluó la preferencia de las ovejas por las fracciones o por su control en bolsas humedecidas con estas sustancias en trece hembras. Se excluyeron dos animales por no cumplir el criterio de inclusión, empleándose once individuos para el análisis.

Las ovejas lamieron las bolsas con tela humedecida con las fracciones e ignoraron las mojadas con control. En este sentido, todas hembras demoraron menos en comenzar a lamer las bolsas humedecidas con las fracciones que con control (A1: 10,0 (9,0) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,012$; A2: 7,0 (6,0) vs control 180,0 (0,0), $T_{(N=11)}=2,0$, $p=0,009$; DCM: 10,0 (10,0) vs control: 180,0 (0,0), $T_{(N=11)}=5,0$, $p=0,022$), no hallándose diferencias entre las tres fracciones ($Fr_{(N=11, df=2)}=0,19$, $p=0,91$, Fig. 10a).

También pasaron más tiempo lamiendo las bolsas humedecidas con fracciones que con control (A1: 37,0 (37,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,012$; A2: 48,0 (26,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,005$; DCM: 26,0 (22,0) vs control: 0,0 (0,0), $T_{(N=11)}=0,0$, $p=0,005$), no difiriendo entre las fracciones ($Fr_{(N=11, df=2)}=1,16$, $p=0,56$, Fig. 10b).

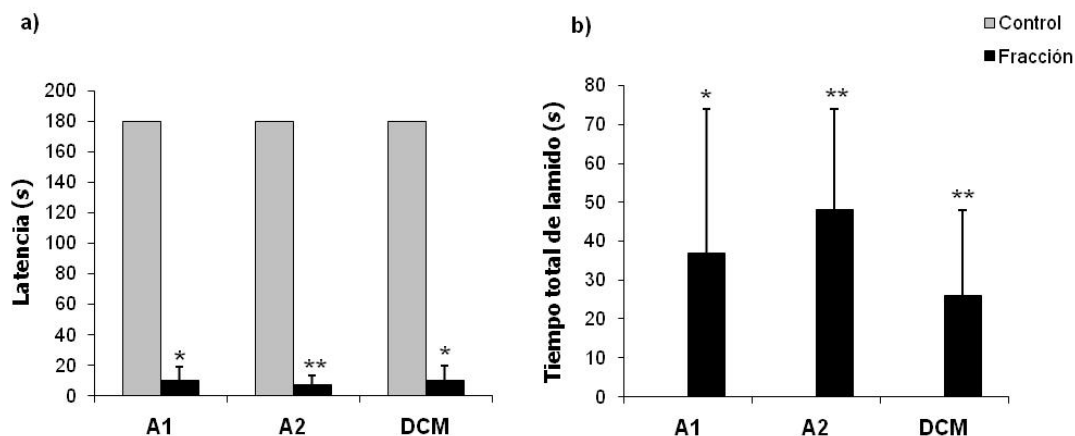


Figura 10. Pruebas de preferencia realizadas durante el parto para evaluar atracción empleando bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecidas con la fracción a estudiar o con control. a) Latencia a lamer bolsa humedecida con las fracciones A1, A2 o DCM y sus controles, b) Tiempo total de lamido de para bolsa humedecida con las fracciones A1, A2 o DCM y sus controles. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizaron los tests Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas. No se encontraron diferencias significativas entre las fracciones. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, respecto a control de cada fracción.

DISCUSIÓN

Repulsión-atracción hacia ALA y LA

El LA resultó repulsivo para las ovejas durante la gestación tardía y atractivo al parto, en concordancia con los resultados obtenidos por Lévy y Poindron (1983, 1987). El ALA sin embargo, resultó un estímulo neutro para las ovejas fuera del parto, cambiando su efecto biológico durante el mismo, pasando a ser atractivo para las hembras. Esta atracción, sin embargo, fue inferior a la inducida por el LA puro. Estos resultados rechazan parcialmente la hipótesis de que el LA y el ALA provocarían en las ovejas el mismo efecto biológico fuera y dentro del período del parto, e indican que al menos algunos de los compuestos responsables del fenómeno de repulsión fuera del parto son diferentes de los que resultan atractivos durante el parto.

Las diferencias en las respuestas de repulsión y atracción provocadas en las ovejas por el ALA y el LA, antes y después del parto, podrían deberse a diferencias en la composición de cada uno de estos FF (tipos de compuestos y concentraciones relativas de los mismos), así como a las propiedades físicas emergentes de los mismos como viscosidad, olor y color. En este sentido, mientras que el ALA se origina

principalmente de la orina fetal y secreciones de las membranas alantoideas (Jainudeen & Hafez, 2002), el LA deriva de la orina fetal pero también de la circulación materna y secreciones fetales de la cavidad oral, vías respiratorias y secreciones anales (Jainudeen & Hafez, 2002). La diferencia en el origen de estos dos fluidos determina sus respectivas composiciones, las cuales difieren en los principales aminoácidos (Ross *et al.*, 1988), así como también en la concentración de iones y creatinina (Williams *et al.*, 1993), entre otros. Así, con base en las propiedades bioquímicas del ALA y el LA, se ha sugerido que el ALA se asemeja a la orina, principalmente por sus altos niveles de creatinina, gamma-glutamina transferasa y fósforo, mientras que el LA se acerca a un transudado de plasma por sus altos valores de sodio y cloruro (Alexander *et al.*, 1958; Williams *et al.*, 1993).

Repulsión-atracción hacia sangre y orina

Tanto la orina como la sangre resultaron repulsivas durante la gestación tardía, sin embargo, únicamente la sangre despertó atracción durante el parto. Esto sugiere que los compuestos presentes en los FF que provocan atracción durante el parto podrían ser componentes constitutivos de fluidos biológicos no relacionados específicamente con el parto o el feto, como la sangre. En este sentido, nuestra hipótesis de que ambos FB inducirían el mismo efecto biológico que los FF en las ovejas fuera y durante el parto sólo se cumplió para el caso de la sangre.

A pesar de las similitudes que se mencionaron anteriormente entre orina y ALA, estos dos fluidos provocaron efectos biológicos diferentes en las ovejas tanto en gestación tardía como al momento del parto: mientras que el ALA pasó de neutro fuera del parto a atractivo durante este período, la orina fue repulsiva antes del parto y se mantuvo repulsiva o volvió neutra al momento del parto. Si bien ambos FF presentan altas concentraciones de orina fetal, ésta difiere en su composición con la de los individuos adultos (Alexander *et al.*, 1958), en parte porque derivan de las membranas alantoideas (Jainudeen & Hafez, 2002; Morris & Barron, 1980) que modifican su composición mediante transferencia activa de proteínas, entre otros procesos (Morris & Barron, 1980). Esta diferencia en la composición de la orina de individuos adultos y el ALA podría dar cuenta de su diferente efecto biológico en las ovejas.

Por otro lado, la respuesta de las ovejas hacia la sangre es similar a la desplegada frente al LA, siendo ambos fluidos repulsivos fuera del parto y atractivos durante el mismo. Esto sugiere que compuestos presentes en ambos podrían ser responsables

de los fenómenos de repulsión y atracción de los FF. Se ha reportado que el LA presenta características bioquímicas relacionadas con el plasma materno y fetal (Alexander *et al.*, 1958; Williams *et al.*, 1993), aunque no se conoce qué compuestos de estos dos fluidos son responsables de su efecto biológico. Sin embargo, características generales de la sangre, más que factores específicos asociados al parto o al feto, estarían implicadas en este fenómeno de repulsión-atracción ya que la sangre empleada en el presente experimento provenía de ovejas vacías.

Posiblemente, la atracción hacia la sangre está relacionada también con el comportamiento “símil carnívoro” observado en la ovejas parturientas al momento de ingerir la placenta. Existen diversas hipótesis para explicar la placentofagia. Algunas de ellas son: a) un cambio transitorio en las preferencias alimenticias de la madre, que en herbívoros se asocia a la ingestión de carne (Hafez, 1987; Leherman, 1961; Melo & González-Mariscal, 2003), b) un aumento en la necesidad de ingerir nutrientes u hormonas presentes en la placenta y/o FF (Richter & Barelare, 1938, Zarrow *et al.*, 1972), c) reponer pérdidas nutricionales generadas por el ayuno previo al parto y el parto en sí mismo (Fraser, 1968; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1994; Zarrow *et al.*, 1972). A su vez, la placentofagia se encuentra asociada con el comienzo de la respuesta maternal al momento del parto y la interacción entre la madre y la cría, esencial para la consolidación del comportamiento maternal (Gonzalez-Mariscal & Poindron, 2002, Kristal *et al.*, 2012, Numan, 1994). Esto concordaría con la idea de que componentes constitutivos de la sangre podrían estar relacionados con el efecto biológico de los FF en las ovejas.

Repulsión-atracción hacia componentes de FF de polaridad media y alta

Durante la gestación tardía las ovejas rechazaron la fracción A1 producto del primer fraccionamiento con hexano, mientras que tras el segundo fraccionamiento con diclorometano las fracciones resultantes, A2 y DCM, perdieron total o parcialmente el valor repulsivo para las hembras. Sin embargo, todas las fracciones resultaron atractivas durante el parto, no perdiendo el valor atractivo luego de los dos fraccionamientos. En este sentido, la hipótesis que planteaba que la fracción A1 conservaría el carácter repulsivo-atractivo de los FF, mientras que las fracciones A2 y DCM habrían perdido dicha característica, no se cumple en el caso del parto.

La pérdida de repulsión por parte de las fracciones A2 y DCM durante la gestación tardía puede explicarse de varias formas. En este sentido, la separación de

compuestos de polaridad alta y media entre las fracciones A2 y DCM, que actuarían sinérgicamente en A1 para ejercer su actividad biológica. La necesidad de una acción sinérgica entre varios compuestos quimiosensoriales ya se ha reportado en la literatura, incluso en la oveja. Así, la combinación de dos fracciones generadas a partir de un extracto de vellón del carnero induce en ovejas en anestro un pico de hormona luteinizante y la consecuente ovulación, de igual forma que el propio olor del carnero, no generándose este efecto si se prueban las fracciones de forma independiente (Cohen-Tannoudji *et al.*, 1994). Recientemente, en bovinos se ha encontrado que los machos despliegan comportamiento copulatorio frente a una mezcla de tres compuestos volátiles presentes en las secreciones vaginales y en las heces de la hembra, pero no despliegan este comportamiento frente a los compuestos aislados (Sankar & Archunan, 2008, 2011; Rajanarayanan & Archunan, 2011).

Sin embargo, la latencia significativamente alta que muestran los animales para alimentarse del recipiente conteniendo ración humedecida con fracción DCM en comparación a su control podría señalar que esta fracción conserva parte del carácter repulsivo de la fracción A1. No obstante, esa repulsión podría requerir la presencia de otro u otros componentes de alta polaridad que luego del fraccionamiento quedaron en la fracción A2 y que por sí mismos no son repulsivos. Un mecanismo similar se ha reportado para la aversión que las ovejas muestran hacia las heces caninas, la cual depende de la presencia de varios compuestos. En este caso, la naturaleza repulsiva de ciertos ácidos grasos se ve aumentada por una pequeña proporción de compuestos neutros como aldehídos, alcoholes y metilcetonas (Arnould *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que los FF son productos de excreción del feto, esos compuestos podrían tener propiedades similares a las de los ácidos grasos presentes en las heces de otros mamíferos. Otros productos de excreción más polares como ácidos de cadena corta o alcoholes, que podrían aumentar el efecto repulsivo de los ácidos grasos libres, podrían haber permanecido en la A2 tras la extracción con diclorometano.

Por último, no se puede descartar que la extracción con diclorometano pudo haber producido una desnaturalización, parcial o completa, de algunos compuestos que resultan repulsivos para las ovejas en preparto, lo que pudo conducir a la pérdida de repulsión de las fracciones A2 y DCM.

En cualquiera de los escenarios presentados anteriormente se necesitan varios compuestos actuando sinérgicamente para producir la respuesta de repulsión en las ovejas fuera del parto. En este sentido, ningún compuesto aislado puede dar cuenta del carácter repulsivo de los FF.

Por otro lado, durante el parto las tres fracciones resultaron atractivas, indicando que varios compuestos despiertan atracción durante el parto, ya que se encuentran en todas las fracciones. Por esta razón, se sugiere que compuestos de alta polaridad como de polaridad media estarían implicados en la atracción de la oveja hacia los FF durante el parto, pero actuando independientemente.

El fraccionamiento utilizado en nuestro estudio no nos permite especular sobre qué compuestos específicos, o qué clase de compuestos puede ser responsable del carácter repulsivo-atractivo de los FF. Mientras que los compuestos altamente lipofílicos, que se extrajeron con hexano, pueden ser excluidos, la diversidad de compuestos fisiológicamente activos de polaridad media y alta es demasiado vasta como para especular sobre los posibles candidatos. Los compuestos de bajo peso molecular tales como los esteroides, ácidos grasos, oligosacáridos o fosfolípidos deben ser considerados, pero incluso pueden ser importante pequeños péptidos o proteínas solubles, ya sea como compuestos activos per se, o como portadores de las moléculas activas. El acoplamiento de métodos de fraccionamiento más finos, tales como los cromatográficos, basados en la exclusión por tamaño o polaridad, permitirían un acercamiento al conocimiento de los compuestos activos de los FF.

Las diferencias entre los fenómenos de repulsión y atracción hacia diferentes compuestos de los FF, se pueden interpretar como consecuencia de diferentes mecanismos controlando estos procesos. Si bien sabemos que cambios en la relación estrógeno/progesterona, así como en los niveles de oxitocina y opioides y la estimulación vagino-cervical, participan del fenómeno de atracción hacia los FF (Kendrick & Keverne, 1991; Keverne, *et al.*, 1983; Lévy *et al.*, 1983; Poindron & Lévy, 1980; Poindron *et al.*, 1980, 1988), no se han caracterizado aún las áreas del sistema nervioso central que controlan los fenómenos de atracción y repulsión. Por ejemplo, en ratas la atracción y repulsión hacia sustancias dulces y amargas están controlados por diferentes circuitos neurales y regiones del cerebro (Reynolds & Berridge, 2003; Kadoisha & Wilson, 2006).

Aunque todas las fracciones y FF resultaron atractivos durante el parto sólo una fracción (A1) y un FF, el LA, resultaron repulsivos fuera del mismo. Sin embargo, la atracción durante el parto no parece implicar una desensibilización general hacia los olores de sustancias de origen biológico, ya que sólo algunas sustancias se vuelven atractivas mientras que otras se mantienen neutras o repulsivas, como la orina y las heces de perro (presente estudio y observaciones no publicadas). En este sentido, este proceso parece ser selectivo y discriminativo.

Finalmente, relacionando los resultados de los tres experimentos se puede decir que la sangre parece ser más repulsiva para las ovejas fuera del parto que el LA y que las fracciones obtenidas a partir de la mezcla de FF. Esto podría relacionarse con el hecho de que la oveja es un herbívoro estricto (fuera del parto). Por otro lado, la fracción A1 resultó más repulsiva que el LA puro. Esto podría deberse a que los compuestos que resultan repulsivos fuera del parto están presentes en A1 en mayor concentración que en el LA, dado que se encuentran excluidos aquellos compuestos que quedaron en la fracción hexano que no despiertan repulsión en las ovejas, pero que podrían contribuir a atenuar el efecto de los compuestos repulsivos al disminuir su concentración. Éstos podrían estar atenuando el efecto biológico de los primeros en el LA. Por otro lado, durante el parto, como era de esperar, el LA fue la sustancia experimental más atractiva para las ovejas.

CONCLUSIONES

1. Los diferentes efectos biológicos inducidos por ALA y LA en la gestación tardía indican que los compuestos responsables de la repulsión estarían presentes sólo en el LA, mientras que la respuesta de atracción que provocaron ambos fluidos indica que al menos algunos componentes que despiertan atracción no son los mismos que provocan repulsión.
2. Determinados componentes constitutivos de la sangre pero no de la orina participarían del fenómeno repulsión-atracción. Dada la similitud de los efectos producidos por la sangre y el LA concluimos que los compuestos responsables de los fenómenos de repulsión y atracción podrían ser componentes generales de la sangre que, pasando a los FF, podrían conferirles su carácter repulsivo-atractivo.
3. La propiedad repulsiva de los FF fuera del parto requiere de la actividad sinérgica de las fracciones de polaridad media y alta, mientras que durante el parto estas fracciones despiertan, de forma independiente, respuestas de atracción, sugiriendo que los compuestos implicados en la repulsión son diferentes de los responsables de la atracción.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos nos planteamos algunas perspectivas para desarrollar en experimentos futuros:

1-Realizar pruebas que empleen otras sustancias de origen biológico relacionadas con el parto y el postparto (como orina del cordero, albúmina, calostro, leche materna) a fin de acercarnos más a la identificación de qué tipo de compuestos están implicados en los fenómenos estudiados. A su vez sería interesante evaluar estas sustancias, así como también las evaluadas en el presente estudio, en corderos de diferentes edades (al momento del parto, a las 6 horas, a las 12 horas, a las 24 horas, a las 48 horas, una semana postparto).

2-Realizar pruebas con comida para el caso de aquellas sustancias que no despiertan atracción durante el periparto (como es el caso de la orina), con el propósito de establecer si son neutras, se mantienen repulsivas, o se transforman en repulsivas durante esta instancia.

3-Comparar la composición de los FF de la oveja con los de aquellas especies en las cuales los FF no son atractivos para las hembras durante el periparto (ejemplo: la vaca).

4-Evaluar el efecto biológico de compuestos como (mencionados en orden creciente de polaridad): ácidos grasos, esteroides tales como los estrógenos, y productos de excreción más polares como ácidos de cadena corta o alcoholes.

5-Emplear herramientas de química analítica para identificar con exactitud qué tipo de compuestos participan en los fenómenos de repulsión y atracción hacia los FF a fin de poder desentrañar la compleja mezcla de señales químicas implicadas en estos procesos.

6-Elaborar procedimientos para facilitar la adopción de corderos abandonados y fomentar el comportamiento de búsqueda de abrigo de las ovejas al momento del parto empleando los compuestos aislados que participan en el fenómeno de atracción hacia los FF durante el parto.

REFERENCIAS

- Alexander, D.P; D.A Nixon; W.F. Widdas & F.X. Wohlzogen. (1958). Gestational variations in the composition of the foetal fluids and foetal urine in the sheep. *Journal Physiology*. 140:1-13.
- Arnould, C., C. Malosse, et al. (1998). Which Chemical Constituents from Dog Feces are Involved in its Food Repellent Effect in Sheep? *Journal of Chemical Ecology*. 24(3): 559-576.
- Carnegie, J.A & H.A. Robertson. (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.
- Cohen-Tannoudji, J., J. Einhorn & J.P. Signoret. (1994). Ram sexual pheromone: first approach of chemical identification. *Physiological Behaviour*, 56(5): 955-961.
- Collias, N. E. (1956). The Analysis of Socialization in Sheep and Goats. *Ecology*, 37(2): 228-239.
- Fraser, A. F. (1968). Reproductive behavior in ungulates. New York. Academic Press.
- Gonzalez-Mariscal, G., V. Díaz-Sanchez, A. I. Melo, C. Beyer & J. S. Rosenblatt. (1994). Maternal behavior in rabbits : Quantification of somatic events, motor patterns, and steroids plasma levels. *Physiology and Behavior*. 55, 1081-1089.
- Gonzalez-Mariscal, G. & P. Poindron. (2002). Parental behavior in mammals : Immediate internal and sensory factors of control. En D. Pfaff, A. Arnold, A. Etgen, S. Fahrbach & R. Rubin (Eds.), *Hormones, brain and behavior*, San Diego. Academic Press. pp. 215-298.
- Gregg, J.K; K.E. Wynne-Edwards. (2006). In uniparental *Phodopus sungorus*, new mothers, and fathers present during the birth of their offspring, are the only hamsters that readily consume fresh placenta. *Developmental Psychobiology* 48: 528-36
- Hafez, E. S. E. (1987). Reproductive behavior. En E. S. E. Hafez (Ed.), *Reproduction in farm animals*, Philadelphia: Lea & Febiger. pp. 260-294.
- Jainudeen, M.R. & E.S.E. Hafez. (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.
- Kristal, M. B. (1980). Placentophagia: a biobehavioral enigma (or De gustibus non disputandum est). Neuroscience and Biobehavioral Reviews 4(2): 141-150.
- Kristal, M. B. J. M. Di Pirro & A. C. Thompson. (2012). Placentophagia in Humans and Nonhuman Mammals: Causes and Consequences. Ecology of Food and Nutrition, 51(3). In press.
- Lehrman, D. S. (1961). Hormonal regulation of parental behavior in birds and infrahuman mammals. En W. C. Young (Ed.), Sex and internal secretions. Baltimore : Williams & Wilkins. pp. 1268-1382.
- Levy, F. (1981). Existence et controle de l'attraction par le liquide amniotique chez la brebis (*Ovis aries*). Master thesis. Physiologie de la Reproduction. Université de Paris VI. .
- Lévy, F., M. Keller & P. Poindron. (2004). Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. Hormones and Behavior 46: 284-302.
- Lévy, F. & P. Poindron. (1984). Influence du liquide amniotique sur la manifestation du comportement maternal chez la brebis parturiente. Biology of Behaviour, 9:271-278.
- Lévy, F. & P. Poindron. (1987). The importance of amniotic fluids for the establishment of maternal behaviour in experienced and inexperienced ewes. Animal behaviour, 35:1188-1192.
- Lévy, F.; P. Poindron & P. Le Neindre. (1983). Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. Physiology and Behavior, 31: 687–692.
- Martin, P & P. Bateson. (1991). La medición del comportamiento. Alianza Editorial S.A., Madrid.
- Melo, A. & G. González-Mariscal (2003). Placentophagia in Rabbits: Incidence Across the Reproductive Cycle. Developmental Psychobiology 43: 37-43
- Morris, I.G & A.A Barron, (1980). The protein composition of sheep foetal fluids. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1, 153-16.
- Numan, M. (1994). Maternal Behavior. En E. Knobil & J. D. Niell (Eds.), The physiology of reproduction. New York. pp. 221-302.

- Neumann, A.; R. F. Hoey, L.B. Daigler; A.C. Thompson & M.B. Kristal. (2009). Ingestion of amniotic fluid enhances the facilitative effect of VTA morphine on the onset of maternal behavior in virgin rats. *Brain Research Bulletin*, 1261: 29-36.
- Pinheiro Machado L.C; J.F. Hurnik & J.H. Burton. (1997). The effect of amniotic fluid ingestion on the nociception of cows. *Physiology and Behavior* 62: 1339-44.
- Poindron, P & P. Le Neindre. (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe. *Advances in the Study of Behavior*, 11: 75–119.
- Poindron, P.; P. Le Neindre; P. Raksanyi, I. Trillat, & P. Orgeur. (1980). Importance of the characteristics of the young in the manifestation and establishment of the maternal behavior in sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 20: 817-826.
- Poindron, P.; F. Lévy; & M. Keller. (2007). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Developmental Psychobiology*, 49: 54–70.
- Poindron, P.; J. Otal; G. Ferreira; M. Keller; V. Guesdon; R. Nowak & F. Lévy (2010). Amniotic fluid is important for the maintenance of maternal responsiveness and the establishment of maternal selectivity in sheep. *Animal* 4(12): 2057-2064.
- Rajanarayanan, S. & G. Archunan (2011). Identification of urinary sex pheromones in female buffaloes and their influence on bull reproductive behaviour. *Research in Veterinary Science*, 91(2): 301-305.
- Richter, C. P. & B. Barelare. (1938). Nutritional requirements of pregnant and lactating rats studied by the self-selection method. *Embriology*, 23: 15-24.
- Rosenblatt, J.S.; H.I. Siegel & A.D. Mayer. (1979). Progress in the study of maternal behavior in the rat: hormonal, nonhormonal, sensory, and developmental aspects. *Advanced in the Study of Behaviour*, 10: 225–311.
- Ross, M.G; Ervin, G; Rappaport, V.J; Youssef, A.; Leake, R.D & Fisher, D.A (1988). Ovine fetal urine contribution to amniotic and allantoic compartments. *Biology of the Neonate*. 53: 98-104.
- Sankar, R. & G. Archunan (2008). Identification of putative pheromones in bovine (*Bos taurus*) faeces in relation to estrus detection. *Animal Reproduction Science*, 103(1-2): 149-153.

- Sankar, R. & G. Archunan (2011). Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of volatile metabolites in bovine vaginal fluid and assessment of their bioactivity. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011: 256106.
- Williams, M.A; S.S. Wallace; J.W. Tyler; C.A. McCall; A. Gutierrez & J.S. Spano. (1993). Biochemical characteristics of amniotic and allantoic fluid in late gestational mares. *Theriogenology*. 40: 1251-1257.
- 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*, 266: 1174-1181.

ANEXO I

Validación del modelo de bolsas para evaluar atracción durante el parto.

Hasta el momento el modelo empleado para evaluar el comportamiento de las ovejas frente a sustancias de origen biológico era el propuesto por Lévy en 1981. Este consiste en ofrecer a las hembras dos recipientes con comida, humedecida con la sustancia biológica a probar o con la sustancia control. Este modelo permite establecer cuáles sustancias resultan repulsivas para las ovejas. Sin embargo, no permite determinar cuándo una sustancia es atractiva, dado que la ingesta de la misma podría implicar simplemente que la sustancia es neutra o no repulsiva, y no que sea atractiva. Además, durante el parto, las ovejas presentan hiperfagia (aumento en la ingesta de alimento) lo que podría implicar la ingesta de todo el alimento ofrecido y el enmascaramiento de la atracción hacia las sustancias a probar.

En este trabajo se propone un nuevo modelo que permite evaluar atracción hacia una sustancia en sí misma, sin el empleo de un estímulo atrayente o reforzador como el alimento. Este modelo consiste en emplear bolsas de goma conteniendo agua con una temperatura aproximada a la temperatura corporal del cordero (39°C) y forradas con una tela similar al pelaje del mismo.

A fin de evaluar la efectividad de este modelo para determinar atracción durante el parto y poder validarlo, se sometió a cada hembra a las dos pruebas de preferencia durante este período, la clásica con comida y el nuevo modelo de bolsas. Todas las pruebas tuvieron una duración de tres minutos. Las pruebas con comida y bolsa se realizaron de forma contrabalanceada en orden temporal y espacial. En todos los casos la ración y bolsa experimental se contaminaron con 20 ml de fluidos fetales (provenientes de un pool generado a partir de varias ovejas, que se conservó refrigerado), mientras que la ración y bolsa control se humedecieron con el mismo volumen de solución de CMC.

Resultados

Se probaron catorce hembras, de las cuales se excluyó una de la prueba con comida y cuatro de la prueba con bolsa por no cumplir con el criterio de inclusión.

Con respecto al tiempo total de ingesta de ración y lamido de bolsa, ambos fueron significativamente mayores para la comida o bolsa con FF que para la que contenía control (comida: 60,0 (25,0) vs control: 15,0 (15,0); $T_{(N=13)}=8,5$, $p=0,017$; bolsa: 142,0 (22,5) vs control: 0,0 (0,0); $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,005$) (Fig. I).

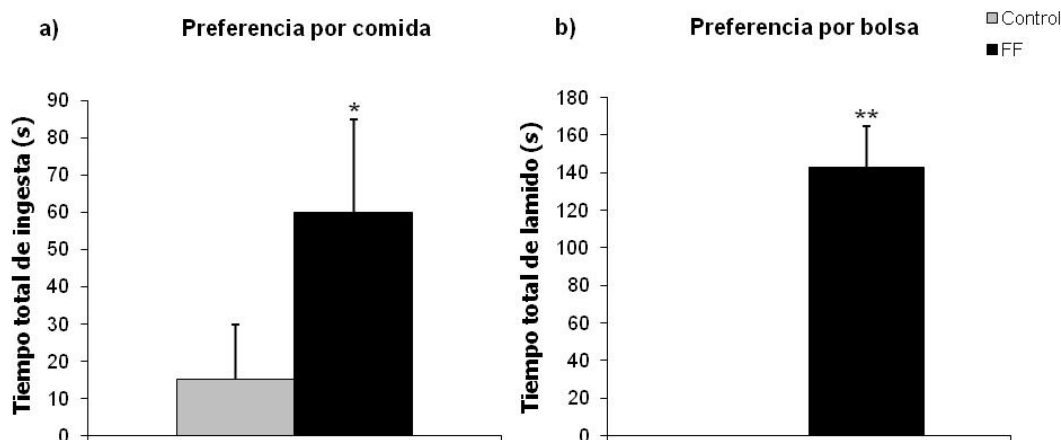


Figura I. Pruebas de preferencia realizadas durante el parto para evaluar atracción empleando el modelo clásico de Lévy (1981) con ración y el de bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecidas con fluidos fetales (FF) o con control. **a)** Tiempo total de ingesta de ración humedecida con fluidos fetales (FF) o su control. **b)** Tiempo total de lamido de bolsa mojada con FF o su control. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, respecto a control.

En la Figura II se encuentran representados el tiempo de ingesta de comida y de lamido de bolsa para los fluidos fetales (FF) y su control para cada minuto de las pruebas. Durante la prueba con comida (Fig. IIa), el tiempo de ingesta de ración humedecida con FF fue mayor que el tiempo de ingesta de comida humedecida con control para el primer minuto (minuto 1: FF: 30,0 (20,0) vs control: 5,0 (5,0); $T_{(N=13)}=6,0$, $p=0,016$), mientras que para los minutos 2 y 3 no se hallaron diferencias significativas entre FF y control (minuto 2: FF: 30,0 (20,0) vs control: 0,0 (0,0); $T_{(N=13)}=8,5$, $p=0,053$; minuto 3: FF: 55,0 (25,0) vs control: 5,0 (5,0); $T_{(N=13)}=12,5$, $p=0,44$). Al comparar los tres minutos entre sí se encontraron diferencias significativas ($F_{(r(N=13,0), df=2,0)}=8,34$, $p=0,015$), las cuales se presentaron entre el minuto 1 y los dos posteriores (minuto 1 vs minuto 2: $T_{(N=13)}=14,0$, $p=0,05$; vs minuto 3: $T_{(N=13)}=6,5$, $p=0,011$).

Por otro lado, el tiempo de lamido de bolsa con FF fue significativamente mayor a su control para los tres minutos de duración de la prueba (minuto 1: FF: 60,0 (0,0) vs control: 0,0 (0,0); $T_{(N=10)}=1,0$, $p=0,007$; minuto 2: FF: 52,5 (7,5) vs control: 0,0 (0,0); $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,012$; minuto 3: FF: 47,5 (12,5) vs control: 0,0 (0,0); $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,008$). A su vez al compararse los tres minutos entre sí se hallaron diferencias entre ellos ($F_{(r(N=13), df=2)}=6,07$, $p=0,05$). Sin embargo, al comparar los tres minutos entre sí de forma pareada no se hallaron diferencias significativas (minuto 1 vs minuto 2: $T_{(N=10)}=0,0$, $p=0,07$; minuto 1 vs minuto 3: $T_{(N=10)}=7,5$, $p=0,14$; minuto 2 vs minuto 3: $T_{(N=10)}=19,0$, $p=0,068$) (Fig. IIb).

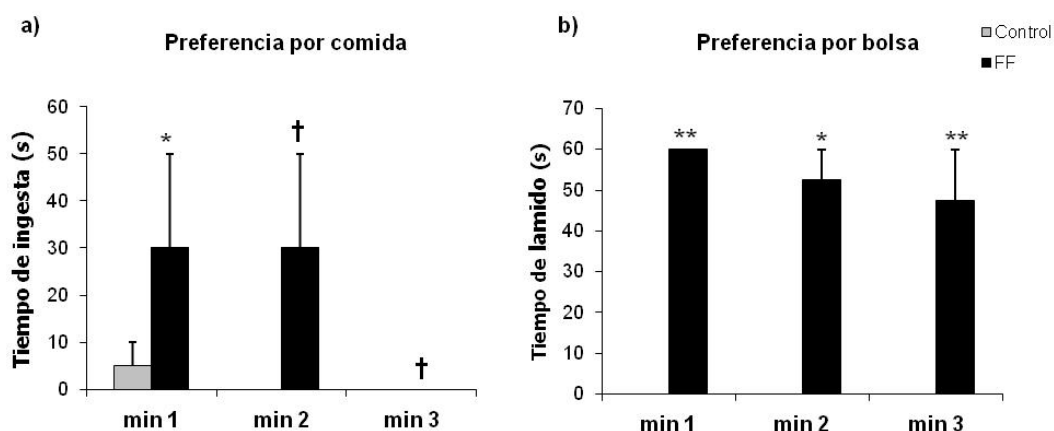


Figura II. Tiempo de ingesta y lamido para cada minuto de las pruebas de preferencia realizadas durante el parto para evaluar atracción. Se empleó el modelo clásico de Lévy (1981) y el de bolsas de agua caliente forradas con tela similar al pelaje del cordero humedecida con fluidos fetales (FF) o con control. **a)** Tiempo de ingesta de ración humedecida con FF y su control para los minutos 1, 2 y 3. **b)** Tiempo de lamido de bolsa humedecida con FF y su control para los minutos 1, 2 y 3. Los datos se muestran en medianas (MAD). Se utilizaron los tests de Friedman de Varianza por Rangos y Wilcoxon para muestras pareadas. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ respecto al control, † $p \leq 0,05$ respecto a minuto 1.

Conclusión

Los resultados permiten afirmar que el modelo de bolsas es efectivo para evaluar atracción durante el periparto, ya que si bien empleando el modelo clásico con comida se observaron diferencias entre los FF y la solución CMC, del análisis discriminado por minuto se desprende que una vez que la comida se terminaba el interés de las hembras desaparecía. Por otro lado, en las pruebas con bolsas el interés de las hembras se mantenía a lo largo de toda la prueba.

Este modelo también tiene la ventaja de que el interés por las sustancias atractivas no se ve enmascarado con otros estímulos positivos como la comida, ya que si bien la tela empleada podría representar un estímulo positivo dada su similitud con el pelaje del cordero, las hembras no se sienten atraídas por la bolsa humedecida con control.

ANEXO II

Actividades y publicaciones surgidas a partir de la presente tesis

Participación en proyecto de investigación financiado

“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. Financiación: CSIC, Proyectos de Vinculación Universidad – Sector Productivo (Modalidad 2), 2008. Período: Junio de 2009-2011.

Presentación en congresos

•**Cawen, E.**; G. Banchemo; L. Sphor; M. Zammit & A. Ferreira. Validación de un método para determinar la atracción hacia los fluidos fetales de la oveja durante el parto. II Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal. Mayo 2009.

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

•Olivera, V.; M. Alsina, **E. Cawen**, M. J. Zuluaga, N. Uriarte, D. Agrati, P. Poindron, G. Banchemo, A. Gonzalez, A. Ferreira. 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*) XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Mayo de 2010.

•**Cawen, E.**; Rivas, M.; L. Zuluaga, M. J., Alsina, M., Olivera, V., Uriarte, N., Agrati, D., Benech, A., Cal, L. & A. Ferreira. Repulsión y atracción hacia fluidos biológicos antes y durante el parto en la oveja (*Ovis aries*). III Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal. Agosto 2011.

Publicación de artículos

Different chemical fractions of fetal fluids account for their attractiveness at parturition and their repulsiveness at late-gestation in the ewe.

Uriarte N, Agrati D, Banchemo D, González A, Zuluaga MJ, **Cawen E**, Olivera V, Alsina M, Poindron P, Ferreira A. Physiology and Behavior. En prensa.



Different chemical fractions of fetal fluids account for their attractiveness at parturition and their repulsiveness during late-gestation in the ewe

Natalia Uriarte^a, Daniella Agrati^b, Georgget Banchemo^c, Andrés González^d, María José Zuluaga^b, Edume Cawen^b, Valentina Olivera^a, Marcela Alsina^a, Pascal Poindron^e, Annabel Ferreira^{b,*}

^a Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^b Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^c Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Ministerio de Agricultura y Pesca, Uruguay

^d Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

^e UMR CNRS-INRA, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2012

Received in revised form 26 May 2012

Accepted 28 May 2012

Available online 31 May 2012

Keywords:

Parturition

Repulsion/attraction

Fetal fluids

Hexane

Dichloromethane

Ewes

ABSTRACT

We have investigated whether the chemical components of fetal fluids (FFs), which elicit repulsion in late gestating ewes, are also those responsible for the attractiveness of fetal fluids at parturition. An aqueous fraction of FFs (A1), obtained after extraction with hexane, was tested for repulsion in late-pregnant ewes and for attraction at parturition. We also investigated if the repulsive and attractive characteristics of this A1 fraction were maintained after an additional extraction with dichloromethane (DCM, CH₂Cl₂) that produced two more fractions (aqueous/high polarity: A2 and dichloromethane/medium polarity: DCM). Thus, late-pregnant ewes were tested for repulsion of aqueous extracts of FFs (A1, A2 and DCM fractions) in a two-choice test of food preference, whereas parturient ewes were tested for attraction toward these same fractions in a two-choice test of licking warm spongy cloths. The A1 fraction was repulsive to late-pregnant ewes and attractive to parturient females. In contrast, neither the A2 nor the DCM fractions were repulsive to late-pregnant ewes, whereas both fractions were attractive to parturient ones. The discordance between the repulsive and attractive properties of the A2 and DCM fractions suggests that the attractiveness of FFs for parturient ewes and its repulsiveness for females outside the peripartum period depend on mixtures of substances that are at least partially different. Some compounds with high and medium polarity in the A2 and DCM fractions would act synergistically to generate the repulsiveness of FFs, whereas both high and medium polarity compounds can evoke attraction independently of each other.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Birth fluids and placenta are potent chemosensory cues in many mammalian species and play an important role in the behavior of the mother and her young during the postpartum period [1–8]. Parturient ewes and goats lick their neonate very actively during the first postpartum hours [4]; in sheep this has been shown to depend on the attraction of the mother to birth fluids [9]. Indeed, the fetal fluids (FFs) and afterbirth materials are strongly repulsive to ewes through their whole reproductive cycle, but become highly attractive at parturition [10,11]. The compounds responsible for this phenomenon of repulsion–attraction have not been identified so far. In an attempt to characterize the chemical nature of the substances involved in the repulsiveness of amniotic fluid (AF) in non-pregnant ewes, Lévy [12]

determined that after an extraction of this fluid with hexane, repulsive substances were contained only in the aqueous polar fraction and not in the low polar one. In addition, after a second extraction of the aqueous fraction with dichloromethane, none of the five fractions obtained showed a significant repulsive activity (see Fig. 1, [12]).

However, to our knowledge, whether the aqueous fraction obtained by hexane extraction or the fractions obtained after extraction by dichloromethane are attractive to parturient ewes has never been investigated. Therefore, it is not clear whether the chemosensory cues responsible for the attractiveness of AF to parturient ewes are the same as those responsible for repulsiveness observed in non-parturient ones. A comparison of the reactions of non-parturient and parturient ewes to these fractions should provide some indication. To assess this question, we studied 1) whether the aqueous fraction (A1) of fetal fluids (FFs) obtained after extraction with hexane was not only repulsive to late-pregnant ewes but also attractive to parturient ewes, and 2) whether this was also the case after performing an additional extraction on the A1 fraction with dichloromethane obtaining two more fractions (aqueous: A2 and dichloromethane:

* Corresponding author at: Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igúí 4225, piso 10, ala sur, CP 1400, Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 25 258618x7151; fax: +598 2525 8617. E-mail address: anna@fci.edu.uy (A. Ferreira).

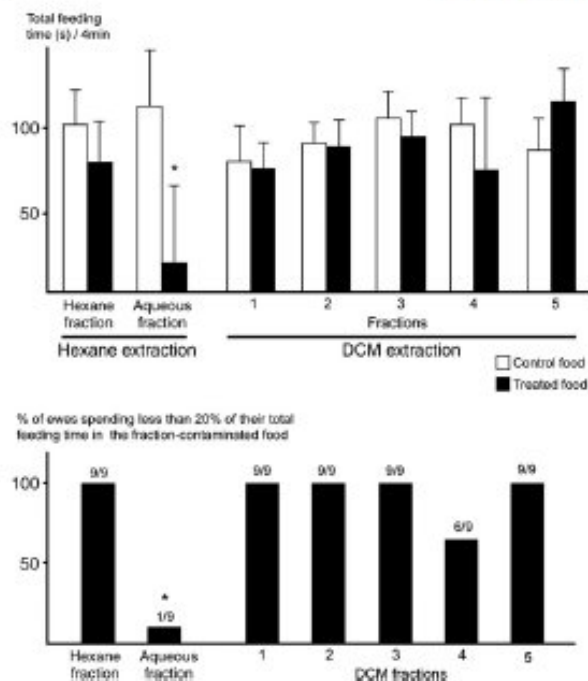


Fig. 1. Consumption of various fractions of amniotic fluids in a two-choice test of food preference between two troughs contaminated or not contaminated with the amniotic fluid extracts (dark and empty bars respectively). Fractions were obtained first from an extraction by hexane (left-hand part of the figure), and then another extraction procedure was carried out on the first aqueous fraction with dichloromethane (DCM), dividing it into five more fractions (right-hand part of the figure). Adapted from Lévy, unpublished Master Thesis, 1981, with permission of the author.

DCM). Differing from Lévy's initial study [12], we used a mixture of allantoic and amniotic fluids, to emulate the natural conditions that occur when parturient ewes lick their neonates, which is when they become attracted to a mix of these two fetal fluids.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Different fractions of FFs were tested in double choice tests using different ewes for repulsion and attraction tests. During late pregnancy, we assessed the repulsion of the ewes to the experimental fractions with a two-choice test between food mixed with the fraction to be tested or with the control substance compound, according to the procedure described by Lévy [10]. On the other hand, at parturition, attraction was measured by a two-choice test between experimental and control fractions placed on warm cloths, since it is not required to increase the ewes' interest with food at that time.

2.2. Animals

We used multiparous ideal ewes from the facilities of the National Agricultural Research Institute (INIA) "La Estanzuela", Colonia, Uruguay. Reproduction was synchronized at ovulation with vaginal sponges (Sintex®) and an injection of pregnant mare stimulating hormone (250 UI, im, Novomon®) at sponge withdrawal, followed by controlled mating with rams. Parturitions were induced by the administration of 15.0 mg of dexamethasone (2.0 mg/mL, im, Disperdex, Dispert, Montevideo), on day 144 of gestation [13]. Deliveries occurred within a 24 h period, starting in average 36 h after the dexamethasone injection. It has already been demonstrated that the endocrine events of parturition induced by dexamethasone are similar to those of spontaneous

parturition and that this procedure does not interfere with the olfactory preference of ewes [14], the establishment of maternal behavior, or the length of the sensitive period [13,15].

During most of the gestation period, ewes were maintained outside on green pasture with access to alfalfa and maize. One week before the injection of dexamethasone, the ewes were habituated daily to stay indoors in individual pens of 2.0 × 2.0 m for 3 h. During this period, two identical troughs of maize were placed on a tray, 10 cm apart, in front of the ewes, to habituate the ewes to the food and troughs in the individual pens. Females remained permanently in individual pens from the time when the dexamethasone injection was applied until the tests were performed during late gestation and parturition. Different ewes were tested in both periods.

This study was approved by the Ethical Committee of the Facultad de Ciencias of the Universidad de la República, Uruguay.

2.3. Collection of FFs and solvent partition of the various fractions

FFs were collected in a first wave of parturitions ($n = 10$) by puncturing the amniotic and allantoic vesicles when they became accessible at the beginning of the parturition process. A pool of FFs (about half of each fluid) was filtered, aliquoted and stored at -20°C until subjected to purification procedures or testing. We verified in a preliminary study that this pool of FFs was repulsive to non-parturient ewes and attractive to parturient ones (results not shown; also, below, see Validation of two-choice test procedure with warm cloths).

Before solvent extraction, the FFs were thawed, filtered through gauze and centrifuged (5000 rpm; 20 min; 4°C). The supernatant was then fractionated by liquid-liquid partitioning, first with hexane and then with dichloromethane. While hexane removes lipophilic compounds, such as fats and hydrocarbons, dichloromethane extracts medium-polarity compounds such as steroids. Solvent extractions were performed sequentially in a 6 L separation funnel. First, 5.5 L of FFs was treated with three successive extractions by 0.5 L of hexane each time, obtaining 4.0 L of an aqueous fraction (A1). This fraction was divided in two halves. One half (2.0 L) was mixed with carbomethyl cellulose (CMC) to mimic the viscosity of FFs, obtaining the A1 fraction used in the behavioral tests. The other half was further treated with three successive extractions by 0.5 L of dichloromethane each time, yielding a second aqueous fraction that was added with CMC to obtain fraction A2. The remaining dichloromethane fraction was evaporated under vacuum and the solid residue was re-suspended in a solution of CMC in water to obtain the DCM fraction.

As a prerequisite, we verified that the CMC and the residues of the solvents used for extraction did not influence the outcome of the tests. In addition, we took into account the fact that the aqueous fractions A1 and A2 had been saturated with organic solvents during the extracting process. Therefore the water to be used for the control fractions in the behavioral tests was also saturated in the same way. First water was saturated with hexane; the hexane was then extracted and half of this water was mixed with CMC, in the same proportion as the experimental fractions, to produce a neutral fraction of CMC that served as the control for A1. The remaining half of water was saturated with DCM, which was then extracted and the water mixed with CMC; this fraction was used as control for A2 and DCM. The aqueous/CMC substance in itself was neither repulsive nor attractive to late-pregnant and parturient ewes in the preliminary observations in which the validation of attraction for raw FFs was carried out ($n = 10$; results not shown).

2.4. Behavioral tests

2.4.1. Late-pregnancy: food preference tests

Late-pregnancy tests were performed on day 145 of gestation, 12 to 24 h before parturition. Food and water were removed from the pen 2 h before the tests, to standardize the physiological state of

ewes and increase their hunger. The principle of the test rested on the ability of the tested fraction to prevent the ewes from feeding on food they were very fond of, maize pellets in this case [10].

Two plastic troughs were placed in front of the ewe on a tray, 10 cm apart, both containing 40.0 g of maize pellets; in one case they were damped with 20.0 mL of the experimental fraction, and in the other with the same volume of the control fraction, both at about 37 °C. The test lasted 3 min, starting when the ewe approached its nose at less than 5 cm from any of the two troughs. During this time, the latency to feed and the cumulative time spent feeding from each trough were recorded with stopwatches by an observer. At the end of the test, the remaining food was weighed to calculate the amount consumed from each trough. The troughs were carefully cleaned with water and dried thoroughly between tests. Different sets of troughs were used for each tested material to avoid risks of chemosensory contamination between the different fractions.

2.4.2. Parturition: warm cloth preference test

Parturition tests were performed just when the amniotic sac was broken, when the lamb's legs were visible, or immediately after the expulsion of the lamb. In this last case, the lambs were removed immediately at birth to prevent any contact with the mothers and were returned to their mothers at the end of the test. All lambs were accepted by their dams when returned.

Before testing, food and water were removed from the pen to reduce possible distractions of the ewe to be tested, and her attraction toward FFs was verified by placing a tray with FFs in front of her snout that elicited their licking behavior. All ewes displayed attraction toward FFs.

The preference for the different fractions at parturition was assessed with a new method not involving the presence of food, as the presence of attractive material was a sufficient incentive for the mother to perform the test (see Validation of two-choice test procedure with warm cloths below). This test consisted of placing two rubber bottles, 10 cm apart, in front of the ewe. These bottles were filled with hot water (around 60 °C) and covered with a removable cotton cloth. Ten milliliters of the experimental fraction was applied with a syringe on one of the cloths, and the same volume of the control fraction was applied on the other cloth (both fractions at about 37 °C). The preference test began when the ewe sniffed one of the cloths (i.e. snout less than 5 cm away from the cloth); then, the latencies to lick as well as the cumulative time spent licking each cloth were recorded during 3 min.

2.5. Inclusion criteria

To be included in the repulsion analysis a ewe had to eat during at least 5 s and, in addition, consume more than 5% of the total food placed in the troughs. For the attraction test the ewe had to sniff the experimental warm wet cloth at least once.

2.6. Validation of the two-choice test with warm cloths

At parturition it is not required to increase the interest of the ewes toward FFs; in addition, food is an attractive stimulus per se, that may mask the reactions of the ewes toward the fractions of FFs. Therefore, we designed a new test in which the attraction of the ewes was assessed by their licking of two water bags covered with a white cotton cloth, mimicking a lamb's coat, one impregnated with an experimental fraction and the other with the control fraction.

To assess whether this procedure was a valid method to detect attraction, parturient ewes were tested by two methods. The first method consisted of offering ewes ($n=13$) the choice between two troughs containing food mixed either with 20.0 mL of FFs or with the same volume of an aqueous solution of CMC as control, according to the procedure described by Levy et al. [10]. In the second method 10 different ewes were offered a choice between two warm cloths,

one wet with 10.0 mL of FFs and the other with the same volume of an aqueous solution of CMC as control. As expected, at parturition, the time spent feeding from the food contaminated with FFs was significantly higher than the time spent feeding from the control trough [FFs: 60.0 s (25.0) vs. 15.0 s (15.0), median (median absolute deviation – MAD); $T_{13}=8.5$, $p=0.016$]. This was also the case for the test using a cloth wrapped around a hot water bag, in which ewes licked the cloth with FFs for a significantly longer period of time than the control cloth [142.5 s (22.5) vs. 0.0 s (0.0), median (MAD); $T_{10}=0.0$, $p=0.005$]. These results show that the two-choice test with warm cloths is a sensible and valid method to test attraction to FFs. In addition, this method avoids any interference of a possible attraction to food and has the advantage that it does not require the ewes to be trained prior to testing.

2.7. Experimental procedure

The preference for the FF fractions was evaluated as follows:

Late-pregnancy Each ewe ($N=18$) was tested three times for her choice between food contaminated with A1, A2 or DCM, or their respective controls. The tests were separated by a period of 3 min, and the order of the tests, as well as the locations (left or right) of the troughs, were counterbalanced. No differences were found between the three successive tests in the total amount of food eaten by the ewes in each test (results not shown). Thirteen of the 18 ewes tested were included in the analysis as they fulfilled the inclusion criteria mentioned above.

Parturition Each ewe ($N=18$) was tested three times for her preference of warm cloths treated with A1, A2 or DCM, or their respective controls. Each test was separated by a 3-min interval. The order of the tests and the location of the bags were counterbalanced, as described in the aforementioned procedure. Eleven of the 18 ewes tested for preference were included in the analysis as they met the inclusion criteria.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as medians and their median absolute deviation (MAD). Food intake is expressed as a percentage of the food intake per trough (food consumed (g) in a trough/total content of food (g) in the trough $\times 100$).

As most variables did not follow a normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test) nor had homogeneous variances (Cochran C test), the data were analyzed by nonparametric tests. Comparisons between two dependent groups were performed using the Wilcoxon matched pair test, and to compare more than two dependent groups we used the Friedman analysis of variance by ranks [22]. Significance was set at $\alpha=0.05$ and bilateral probabilities were used.

3. Results

3.1. Late pregnancy

The latency to feed from the A1-treated food was higher than the latency to feed from the control trough (Table 1). In addition, ewes ate a lower percentage of food (Table 2) and spent less time feeding from the food contaminated with A1 than from the control food ($T_{13}=6.0$, $p=0.006$; see Fig. 2A). In contrast, concerning the A2 fraction, neither the latency to eat (Table 1), the percentage of food ingested (Table 2), nor the time spent feeding ($T_{13}=28.0$, $p=0.39$; Fig. 2A) differed significantly between the A2 and control troughs. In the case of the DCM fraction, the latency to eat food contaminated

Table 1

Latencies (s) taken by late-pregnant ewes (upper part of table) to feed in a two-choice test between troughs contaminated with carboxymethyl cellulose (control) or with one of three fractions of fetal fluids (fraction) or by peri-parturient ewes (lower part of table) to lick warm cloths contaminated with carboxymethyl cellulose or with these same extracts.

Latencies (s)	Tested fraction	Control	Fraction	T	p
Repulsion in late pregnancy	A1	3.0 (2.0)	146.0 (34.0)	4.0	0.04
	A2	10.0 (10.0)	34.0 (32.0)	38.0	0.60
	DCM	3.0 (2.0)	56.0 (25.0)	14.5	0.03
	F_r	2.21	32.4		
	p	0.33	0.20		
Attraction at parturition	A1	180.0 (0.0)	10.0 (9.0)	0.0	0.01
	A2	180.0 (0.0)	7.0 (6.0)	2.0	0.01
	DCM	180.0 (0.0)	10.0 (10.0)	5.0	0.02
	F_r	0.86	0.20		
	p	0.65	0.91		

Latencies are expressed as median (s) and their median absolute deviations (MAD). A1: aqueous fraction resulting from extraction of fetal fluids with hexane, A2: aqueous fraction resulting from extraction of A1 with dichloromethane, DCM: DCM fraction. T and p values that represent significant differences are signaled with bold font, while non significant differences in cursive.

with this fraction was significantly higher than the latency to eat control food (Table 1). However, the time spent feeding from the trough containing the DCM fraction did not differ from the time feeding in the control trough ($T_{13} = 26.0$, $p = 0.17$, Fig. 2A), even though ewes tended to ingest a lower percentage of food from the trough with the DCM fraction than from the control trough (Table 2; $p = 0.08$).

When comparing the A1, A2 and DCM fractions, the latencies to feed did not differ significantly among fractions (Table 1), whereas the time spent feeding actually did ($F_{(13,2)} = 6.78$, $p = 0.04$; Fig. 2A). Thus, the feeding time from the trough with the A1 fraction was significantly lower than the feeding time from the trough with the A2 fraction ($T_{13} = 4.0$, $p = 0.006$). It also tended to be lower than the time of feeding in the DCM trough ($T_{13} = 1.0$, $p = 0.09$). Finally, feeding time in the DCM trough did not differ from that in the A2 trough ($T_{13} = 28.0$, $p = 0.39$).

3.2. Parturition

Parturient ewes displayed significantly shorter latencies to lick any of the three experimental fractions A1, A2 and DCM than to lick their respective controls (Table 1) and they also licked them for a significantly longer period of time than control cloths ($T_{11} = 0.0$, $p = 0.012$; $T_{11} = 0.0$, $p = 0.005$; $T_{11} = 0.0$, $p = 0.005$ respectively; Fig. 2B).

On the other hand, the latency to lick (Table 1) and the time spent licking ($F_{(11,2)} = 1.16$, $p = 0.56$, Fig. 2B) did not differ significantly between the A1, A2 and DCM fractions.

Table 2

Percentage of food consumed by late-pregnant ewes (food consumed (g)/total food contained in trough (g) × 100) in a two-choice test between troughs contaminated with carboxymethyl cellulose (control) or with one of three fractions of fetal fluids (fraction).

Percentage of food intake	Tested fraction	Control	Fraction	T	p
Percentage of food intake	A1	100.0 (0.0)	6.7 (6.7)	6.0	0.006
	A2	97.5 (2.5)	97.1 (2.9)**	28.0	0.38
	DCM	100.0 (0.0)	38.7 (38.7)*	1.78	0.08
	F_r	0.77	10.7		
	p	0.68	0.005		

Data are expressed as medians and their median absolute deviation (MAD). A1: aqueous fraction resulting from extraction of fetal fluids with hexane, A2: aqueous fraction resulting from extraction of A1 with dichloromethane, DCM: DCM fraction. T and p values that represent significant differences are signaled with bold font, while non significant differences in cursive.

** $p < 0.005$, A1 vs. A2; Wilcoxon matched pair test.

* $p < 0.05$, A1 vs. DCM; Wilcoxon matched pair test.

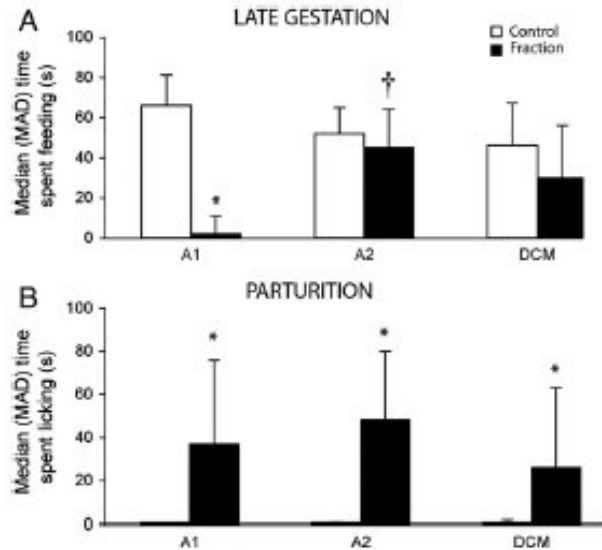


Fig. 2. Behavioral preference of late-pregnant and parturient ewes in a two-choice test when given the choice between a control substance (carboxymethyl cellulose) — empty bars and different fractions of fetal fluids — dark bars, obtained first by an extraction with hexane (A1) and then with dichloromethane (A2 and DCM). Panel A: Total time of food intake (s) of late-pregnant ewes. Panel B: Total time spent by parturient ewes licking a warm cloth. Data are expressed as median and their median absolute deviations (MAD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ between fraction and control, † $p < 0.01$ between A1 and A2, Wilcoxon matched pair test.

4. Discussion

Our results show that the aqueous fraction of FFs obtained after hexane extraction was active, whereas the two fractions resulting from DCM extraction had partially or completely lost their repulsive characteristic. These results are congruent with those obtained by Lévy [12] for AF outside of the peripartum period (Fig. 1). In contrast with the loss of repulsion, the DCM extraction did not lead to a loss of attraction for parturient ewes. Thus, parturient females exhibited a clear attraction for the A1, A2 and DCM fractions while showing no interest toward the control cloths. As a whole, the dissociation between the repulsive and attractive characters of the FF fractions studied indicates that the actual compounds responsible for repulsiveness are different from those accounting for attractiveness.

There are several possible explanations for the loss of repulsiveness of the A2 and DCM fractions. First, it could result from the separation of compounds of high and medium polarity, which act synergistically within the A1 fraction to exert their biological activity. The necessity of a synergic action by several chemosensory compounds has been reported in other instances, including in sheep [16–19].

Taking into account the significantly higher latency of late-pregnant ewes to feed from the DCM fraction than from the control one, it is also possible that the DCM fraction maintained part of the repulsive character of the A1 fraction, but the presence of other high-polarity component(s) contained in the A2 fraction is needed to enhance the repulsiveness of some components present in DCM fraction. A similar mechanism has been reported regarding the aversion of sheep toward canine feces, which depends on the presence of various compounds. In this case, the repulsive nature of some fatty acids is enhanced by a small proportion of neutral compounds such as aldehydes, alcohols and methyl-ketones [20]. In the present study, no attempts were made to chemically characterize the fractions, but it would be worthwhile to investigate whether compounds such as free fatty acids, that remained in the A1 fraction after hexane extraction are the main compounds responsible for the fraction's repulsiveness. Indeed, as FFs contain excretion products from the fetus, such

compounds could have similar properties to the fatty acids in the feces of other mammalian species. Other excretion products with higher polarity such as short-chain acids or alcohols that could enhance the repulsive effects of free fatty acids may have remained in the aqueous fraction A2 after the extraction with DCM. Finally, it cannot be excluded that the DCM extraction led to partial or complete denaturing of some repulsive compound(s), thus contributing also to the decreased repulsiveness of the A2 and DCM fractions.

Whatever the reason for the loss of repulsiveness after DCM extraction, no parallel impairing of attraction in parturient ewes was observed for these fractions, thus supporting the hypothesis that at least some of the compounds involved in repulsiveness differ from those involved in attraction. However, it could be argued that the different activity of these fractions for attraction and repulsion was due to the fact that different methods were used to test attraction at parturition and repulsion in late-pregnant females. When parturient ewes were tested, they had the choice between the experimental and the control cloth that presumably was of no interest to them, whereas in late-pregnant ewes, the control trough contained food, and thus presented at least some interest. Consequently, the nature of the test could have enhanced the contrast between control and experimental fractions when testing for attraction. Nonetheless, this is not likely to be the case in the light of the results reported by Lévy et al. [10] in parturient ewes tested for attraction toward AF, using a two-choice test with food. In their study, ewes consumed very little from the control trough and spent more than 80% of their feeding time in the trough containing food contaminated with AF [10].

As a whole, our results suggest that the repulsive characteristic of the FFs is due to a mixture of high and medium polarity compounds that need to act together to be active. On the other hand, attraction may imply both high and medium polarity components that can be partitioned in biologically active substances between the DCM and A2 fractions. In addition, these high and medium polarity compounds appear to keep their attractive properties even when separated. The crude fractionation used in the present study prevents us from speculating which specific compounds, or even classes of compounds, may be responsible for the repulsion/attraction activities. Whereas highly lipophilic compounds, which would be extracted by hexane, can be excluded, the array of medium to highly polar physiologically active compounds is too vast to speculate on which one could be responsible. Low molecular weight compounds such as steroids, fatty acids, oligosaccharides or phospholipids are all possible candidates, but even peptides or small soluble proteins may be important, either as active compounds per se, or as carriers of the active molecules. The coupling of a finer fractionation method, such as one based on size exclusion or polarity-based chromatography, with a simpler bioassay, would undoubtedly facilitate a closer approximation to the active compounds.

The capacity of the parturient mother to be attracted toward these compounds does not depend on complete desensitization to any repulsive compound, since some aversive substances such as feces [21] or bovine AF stay repulsive even at parturition (Poindron, personal observations; [14]). Finally, looking for the differences in composition between sheep FFs and of other species whose FFs are not attractive to

parturient ewes (e.g., cows' amniotic fluid [14]) may be a promising way to clarify what types of compounds are responsible for AF attraction in sheep.

Acknowledgments

CSIC (Proyecto SP2-703) and ANII (SNI, SNB) supported this study.

References

- [1] Kristal MB, Whitney JF, Peters LC. Placenta on pups' skin accelerates onset of maternal behaviour in non-pregnant rats. *Anim Behav* 1981;29:81–5.
- [2] Steuer MA, Thompson AC, Doerr JC, Youakim M, Kristal MB. Induction of maternal behavior in rats: effects of pseudopregnancy termination and placenta-smeared pups. *Behav Neurosci* 1987;101:219–27.
- [3] Vince MA. Newborn lambs and their dams: the interaction that leads to sucking. In: Slater PJB, Rosenblatt JS, Snowdon CT, Milinski M, editors. *Advances in the study of behavior*. Academic Press; 1993. p. 239–68.
- [4] Poindron P, Levy F, Keller M. Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol* 2007;49:54–70.
- [5] Poindron P, Otal J, Ferreira G, Keller M, Guesdon V, Nowak R, et al. Amniotic fluid is important for the maintenance of maternal responsiveness and the establishment of maternal selectivity in sheep. *Anim* 2010;4:2057–64.
- [6] Levy F, Kendrick KM, Keverne EB, Piketty V, Poindron P. Intracerebral oxytocin is important for the onset of maternal behavior in inexperienced ewes delivered under peridural anesthesia. *Behav Neurosci* 1992;106:427–32.
- [7] Dunbar L, Ranson E, Buehler M. Pup retrieval and maternal attraction to canine amniotic fluids. *Behav Processes* 1981;6:249–60.
- [8] Kristal MB. Enhancement of opioid-mediated analgesia: a solution to the enigma of placental phagocytosis. *Neurosci Biobehav Rev* 1991;15:425–35.
- [9] Levy F, Poindron P. The importance of amniotic fluids for the establishment of maternal behaviour in experienced and inexperienced ewes. *Anim Behav* 1987;35:1189–92.
- [10] Levy F, Poindron P, Le Neindre P. Attraction and repulsion by amniotic fluids and their effect on control in the ewe around parturition. *Physiol Behav* 1983;31:687–92.
- [11] Collias NE. The analysis of socialization in sheep and goats. *Ecology* 1956;37:228–39.
- [12] Levy F. Existence et contrôle de l'attraction par le liquide amniotique chez la brebis (*Ovis aries*). In: Master thesis. *Physiologie de la Reproduction*. Université de Paris VI; 1981.
- [13] Poindron P, Le Neindre P. *Advances in the Study of Behavior* 1980;11.
- [14] Arnould C, Piketty V, Lévy F. Behaviour of ewes at parturition toward amniotic fluids from sheep, cows and goats. *Appl Anim Behav Sci* 1991;32:191–6.
- [15] Poindron P, Martin GB, Hooley RD. Effects of lambing induction on the sensitive period for the establishment of maternal behaviour in sheep. *Physiol Behav* 1979;23:1081–7.
- [16] Cohen-Tannoudji J, Einhorn J, Signoret JP. Ram sexual pheromone: first approach of chemical identification. *Physiol Behav* 1994;56:555–61.
- [17] Rajanarayanan S, Archunan G. Identification of urinary sex pheromones in female buffaloes and their influence on bull reproductive behaviour. *Res Vet Sci* 2011;91:301–5.
- [18] Sankar R, Archunan G. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of volatile metabolites in bovine vaginal fluid and assessment of their bioactivity. *Int J Anal Chem* 2011;2011:256106.
- [19] Sankar R, Archunan G. Identification of putative pheromones in bovine (*Bos taurus*) feces in relation to estrus detection. *Anim Reprod Sci* 2008;103:149–53.
- [20] Arnould C, Malosse C, Signoret J-P, Descoins C. Which chemical constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep? *J Chem Ecol* 1998;24:559–76.
- [21] Suárez E, Orihuela A. The effect of exposure to feces from four farm species on the avoidance behaviour and feed consumption of sheep. *Livest Prod Sci* 2002;77:119–25.
- [22] Siegel S, Castellan Jr NJ. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. London: McGraw-Hill; 1988.