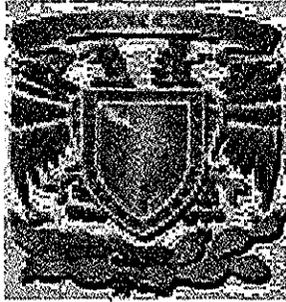


03040
7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**"LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES A ESTRADIOL EN EL
HIPOTALAMO DE LA OVEJA Y SUS VARIACIONES EN
RELACION CON EL PARTO Y LA CONDUCTA MATERNAL".**

MATEO ALONSO GONZALEZ TORRES

TUTOR

Dr. PASCAL POINDRON MASSOT

COMITÉ TUTORAL

Dr. Raúl G. Paredes Guerrero

Dr. Alfredo Varela Echavarría

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Generalidades	3
1. La conducta maternal en mamíferos	3
2. Descripción de la conducta maternal en ovinos	5
3. Estro post-parto	5
4. Factores fisiológicos involucrados en la facilitación de la CM en ovinos	6
5. La importancia de la experiencia maternal previa	9
a) La experiencia maternal en la rata	9
b) La experiencia maternal en la oveja	10
B. Mecanismos de acción del estradiol	11
1. El estradiol (breve reseña)	11
2. El estradiol y su receptor	12
3. Técnicas de visualización de los receptores a estradiol en el cerebro	14
C. Estructuras centrales involucradas en el control de la conducta maternal	16
1. Area preóptica media (APOM)	16
2. Amígdala medial (AM)	18
3. Núcleo base de la stría terminal y séptum (NBST)	20
4. Núcleo paraventricular (NPV)	20
5. Núcleo supraóptico (NSO)	22
6. Hipotálamo medio basal (HMB)	23
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
A. General	
B. Específicos	

VI. ANIMALES, MATERIALES Y MÉTODOS	28
A. Animales	28
B. Tratamientos generales	29
1. Grupo al estro	
2. Grupo al parto	
C. Colecta de los cerebros, inmunohistoquímica y análisis de los cortes	30
1. Sacrificios	30
2. Preparación del tejido	30
3. Inmunohistoquímica	32
4. Análisis del tejido	33
D. Variables analizadas y métodos estadísticos	34
VII. RESULTADOS	36
A. Descripción general y análisis cualitativo	36
1. Características de las células IR-RE2	36
2. Distribución general de los receptores a estradiol	36
3. Estudio de las estructuras de interés	41
a. área preóptica media	41
b. núcleo supraóptico	41
c. núcleo paraventricular	41
d. amígdala media	41
e. hipotálamo medio basal	42
B. Análisis cuantitativo	49
1. área preóptica media	49
2. núcleo supraóptico	52
3. núcleo paraventricular	54
4. amígdala media	56
5. hipotálamo medio basal	58
6. Influencia del origen de los animales	60
VIII. DISCUSIÓN	65
IX. CONCLUSIONES	71
X. REFERENCIAS	72
XI. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	87

RESUMEN

La expresión de la conducta maternal (CM) en la oveja parturienta está regulada por la presencia de factores fisiológicos claves como lo son la estimulación vaginocervical debida a la expulsión del feto y a altos niveles de estradiol (E2). Además, la capacidad de estos factores para inducir la conducta maternal se ve facilitada por la experiencia maternal previa. En la oveja, existen pocos estudios encaminados a identificar las estructuras neuroanatómicas involucradas en la expresión de esta conducta, sin embargo ninguno de ellos ha estudiado donde actúa el estradiol para facilitar la conducta maternal. El objetivo de este trabajo fue estudiar las estructuras cerebrales en las cuales actúa el E2 sobre su receptor al momento del parto, y comprobar si la mayor eficacia a la acción de los esteroides en hembras con experiencia maternal previa está relacionada con un gran número de células que expresan el receptor a estradiol (RE2). Se estudiaron cuatro grupos: ovejas multíparas y nulíparas al estro (n=8 y n=7: grupos controles con E2 y sin CM), ovejas multíparas y nulíparas al parto (n=10 y n=9: E2 y CM). Este estudio se realizó con la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal 1D5 anti-RE2 (DAKO) sobre cortes coronales flotantes de las regiones hipotalámicas. El conteo celular se llevó a cabo con el sistema de análisis de imágenes BiocomHisto 5000 sobre 3 cortes por estructura y por animal en las siguientes áreas: área preóptica medial (APOM), núcleo supraóptico (NSO), núcleo paraventricular (NPV), amígdala medial (AM) e hipotálamo medio basal (HMB).

Se encontraron células inmunoreactivas en todas las estructuras estudiadas, incluyendo el NSO y el NPV. Por otra parte, se encontraron diferencias cualitativas con respecto al tipo de marcaje, el cual fue nuclear principalmente en la AM, así como en el NSO y el NPV en la condición estro. Por el contrario, en el APOM, así como en el NSO y NPV al parto, el marcaje fue nuclear y citoplásmico (APOM) y principalmente citoplásmico NSO y NPV). El número de células marcadas fue significativamente más alto en los grupos al estro que en los grupos al parto en todas las estructuras, salvo para la AM donde no existieron variaciones en los grupos analizados. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en relación al número de partos previos y/o la experiencia maternal previa en ninguna de las estructuras estudiadas. Estos resultados sugirieren la existencia de una regulación negativa de la hormona sobre su receptor al momento del parto, debida a una liberación masiva del E2 en este momento.

SUMMARY

The expression of maternal behavior (MB) in parturient sheep, is regulated by physiologic factors such as the vaginocervical stimulation due to fetus expulsion and high prepartum levels of estradiol (E2). Furthermore, the capacity of these factors to induce maternal behavior is facilitated by previous maternal experience. In sheep, few studies have investigated the neuroanatomic structures involved in the expression of this behavior, and none of them have studied where the estradiol may act to facilitate maternal behavior. The aim of this work was to study the brain structures in which the E2 acts on its receptor at time of parturition, and to verify if the higher efficacy of estradiol action in females with previous maternal experience could be related with a higher number of cells expressing the estradiol receptor (ER2), measured by immunohistochemistry. Four groups were studied: multiparous and nuliparous ewes at estrous (n=8 and n=7: control groups with E2 / without MB), multiparous and nuliparous parturients ewes (n=10 and n=9: with E2 and MB). In this study, the immunohistochemistry technique was carried out using the monoclonal antibody 1D5 anti-ER2 (Dako company) in coronal floating sections. The cellular count was made with the image system BiocomHisto 5000, in three sections by structure/animal in the following areas: medial preoptic area (MPOA), supraoptic nucleus (SON), paraventricular nucleus (PVN), medial amygdala (MA) and medio basal hypothalamus (MBH).

Immunoreactive cells were found in all the studied structures, including the SON and PVN. On the other hand qualitative differences were found with respect to the type of labelling. It was mainly nuclear in MA and MBH, and also in the SON and PVN in the estrous condition. By contrast in the MPOA, as well as in the SON and PVN at parturition, labelling was nuclear and cytoplasmic (MPOA) or mainly cytoplasmic (PVN and SON). The number of immunostaining cells was significantly higher in the estrous than in the parturition groups in all the structures, except the MA. On the other hand, no significant differences were found in relation with the number of previous parturition and/or the previous maternal experience. These results suggest the presence of a down-regulation of ER2 by E2 at parturition, when this hormone reaches its highest levels during the reproductive cycle.

I. INTRODUCCIÓN

La conducta maternal en mamíferos se caracteriza por un cuidado intensivo de la cría por su madre, quien representa su única fuente de alimentación durante el inicio de su vida. Tanto en especies de crías precoces como en especies de crías altriciales, la adecuada manifestación de la conducta maternal es importante para la sobrevivencia de las crías. El recién nacido posee pocas reservas energéticas y una limitada termorregulación, de manera que es importante el rápido establecimiento de una relación muy estrecha entre la madre y la cría para que ésta pueda sobrevivir y desarrollarse. Se ha reportado en ovejas que la falta de un vínculo maternal estable es una posible causa de mortalidad neonatal (Alexander, 1984; Poindron, Delgadillo, Flores *et al.*, 1996; Stevens, Alexander y Lynch, 1982), mientras que en la rata, la construcción de un nido y el lamido anogenital de las crías son fundamentales para su sobrevivencia; (Brouette-Lahlou, Godinot y Vernet-Maury, 1999; Rosenblatt, 1969).

En la mayoría de los mamíferos estudiados, la activación de la conducta maternal (CM) depende de la presencia de factores fisiológicos asociados con el parto que facilitan su rápido y completo despliegue (Bridges, 1996; Lévy, Kendrick, Keverne *et al.*, 1996; Numan, 1994; Poindron, Caba, Gomora Arrati *et al.*, 1993). Una excepción es el ratón, en donde la sola presencia de las crías puede inducir una conducta materna con latencias muy cortas (Noirot, 1972).

El estradiol (E2) ha sido el principal factor identificado en la facilitación de la conducta maternal en la rata al momento del parto, en conjunto con otros factores tales como la prolactina (PRL) y la oxitocina (OT) (Bridges, 1990; Numan, 1994; Rosenblatt, Siegel y Mayer, 1979; Rosenblatt, Mayer y Giordano, 1988). Los mecanismos de acción del estradiol han sido ampliamente estudiados en especies de laboratorio que paren crías altriciales o poco desarrolladas (rata, ratón, coneja); en cambio, existen pocos estudios en especies que paren crías precoces, como los ungulados (ovejas, cabras) quienes nacen con un mayor grado de desarrollo motor. Dichas especies representan por consiguiente una alternativa interesante a los modelos de laboratorio para ampliar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de control de la conducta maternal en mamíferos.

Por ejemplo, se ha demostrado que en la oveja, el E2 es necesario para la activación de la conducta maternal al parto. Sin embargo, por si sola esta hormona es poco eficaz, y necesita de la presencia de estimulación vaginocervical (EVC) causada por la expulsión del feto, para que se lleve a cabo la manifestación completa e inmediata de la CM. Así mismo, los mecanismos por los cuales actúa dicha hormona aún se desconocen.

Por otra parte, la experiencia maternal juega un papel importante en la facilitación de la CM. En diferentes especies de mamíferos, la experiencia post-parto facilita la manifestación ulterior de la conducta maternal hacia nuevas camadas (Bridges, Feder y Rosenblatt, 1977; Orpen y Fleming, 1987; Poindron, Le Neindre, Raksanyi, *et al.*, 1980a). En particular, facilita la acción de factores hormonales como el E2 y la OT intracerebral, y de factores sensoriales exteroceptivos y propioceptivos (señales olfatorias, estimulación vaginocervical).

En la oveja, existen pocos trabajos que han estudiado la localización de áreas sensibles al estradiol en el cerebro, y estos han sido más bien relacionados a la conducta sexual (CS) o con los mecanismos de acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (Blache, Batailler y Fabre-Nys, 1994; Herbison, Robinson y Skinner, 1993; Lehmann, Ebling y Karsh, 1993), mientras que nadie ha llevado a cabo el estudio de las áreas sensibles al estradiol en relación con el parto y la conducta materna.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es estudiar las áreas cerebrales posiblemente relacionadas con la facilitación de la conducta maternal en la oveja. Estos estudios se realizarán con ayuda de técnicas de inmunohistoquímica que permiten observar las regiones en donde existen receptores a los cuales el estradiol es susceptible de unirse para facilitar la CM. Por otro lado, se comprobará si la experiencia maternal influye sobre el número de células que expresan receptores a estradiol (RE2), comparando su expresión en ovejas con experiencia maternal previa y en ovejas sin experiencia, puesto que resultados obtenidos en ratones sugieren que existe un aumento en el número de células que contienen RE2 en relación con la experiencia previa (Ehret y Buckenmaier, 1994; Koch y Ehret, 1989). Eso podría ser uno de los factores que incrementa la capacidad del estradiol para activar la CM en hembras con experiencia maternal previa.

II. ANTECEDENTES

A. GENERALIDADES

1. La conducta maternal en mamíferos

La conducta maternal está dentro de la categoría de la conducta parental, la cual puede definirse como cualquier comportamiento de un miembro adulto de una especie hacia un organismo reproductivamente inmaduro de la misma especie y que permita su sobrevivencia y desarrollo.

En los mamíferos, la hembra es la que alimenta al recién nacido y por lo tanto es la principal responsable del cuidado parental. Sin embargo, en algunas especies de roedores, carnívoros y primates, el padre también provee cuidados importantes al recién nacido, lo cual se puede referir como comportamiento paterno (Alberts y Gubernick, 1990; González-Mariscal y Poindron, 2002)

Por otra parte, el grado de desarrollo que posee la cría al nacer es uno de los elementos que caracteriza el tipo de relación que existe entre la madre y la cría. En los mamíferos se pueden distinguir tres tipos de relación dependiendo de las características del neonato:

En especies de crías *altriciales*, la conducta maternal está organizada en relación con la presencia de un nido y la madre generalmente cuida cualquier cría que se encuentre dentro de éste (Rosenblatt y Siegel, 1981). Las crías son mantenidas en un nido que la madre construye antes del parto y en el cual les amamanta; además, cuando la madre se encuentra dentro del nido, también confiere calor corporal a la camada.

En el caso de los primates, los infantes están poco desarrollados desde el punto de vista motor; sin embargo, la maduración sensorial es mayor que en crías altriciales. Las madres generalmente no construyen un nido, pero acarrear a sus crías. Por tanto, el contacto físico también es muy estrecho entre la madre y el recién nacido, quien recibe mucha estimulación táctil, y este tipo de relación madre-infante es conocido como *matricolia* (Poindron, Nowak, Lévy *et al.*, 1993).

En el caso de especies de crías *precoces*, las crías tienen un avanzado desarrollo sensorial y motor, como es el caso de los ungulados. En rumiantes domésticos, el reconocimiento madre-cría tiene lugar dentro de las primeras 2 a 4 horas post-parto, lo cual representa una característica típica de este tipo de relación (Poindron *et al.*, 1980a; Romeyer y Poindron, 1992). Este reconocimiento permite a la madre discriminar entre crías propias y ajenas y con ello orientar selectivamente la conducta maternal a su progenie desde las primeras horas post-parto, rechazando cualquier cría que intente amamantarse de ella.

2. Descripción de la conducta maternal en ovinos.

Los ovinos son animales de reproducción estacional (al menos en latitudes subtropicales y templadas) y su época de crianza ocurre normalmente al final del invierno e inicio de la primavera, durante un periodo relativamente corto, lo cual permite al recién nacido un óptimo crecimiento y desarrollo. Tanto en los ovinos salvajes como los domésticos que viven en condiciones extensivas (pastoreo a campo abierto), las hembras adultas y sus crías forman rebaños que comparten un espacio en común (Arnold y Dudzinski, 1978; Geist, 1971; Grubb y Jewel, 1966; L'Heureux, Lucherini, Festa-Bianchet *et al.*, 1995; Rowell, 1991). Los grupos sociales se desplazan frecuentemente para buscar alimento, y es necesario que las crías se muevan pronto para seguir a sus madres. El establecimiento de un vínculo selectivo entre la madre y la cría es esencial para la sobrevivencia de ésta.

La capacidad de la hembra de mostrar una conducta maternal adecuada y completa en presencia de un recién nacido (receptividad maternal) no es un estado permanente en los rumiantes, al contrario de lo que se observa en ratones (Koch y Ehret, 1989; Noirot, 1972) o en ratas con experiencia maternal (Bridges 1990; Rosenblatt, Siegel y Mayer, 1979). En la oveja, se ha demostrado que dicha receptividad está presente solo por unas horas alrededor del parto. La CM se puede observar de 2 a 4 horas antes del parto (Arnold y Morgan, 1975) y si la madre es privada de su cordero inmediatamente después del parto, la receptividad maternal desaparece dentro de 4 a 12 horas en la mayoría de los casos (Poindron, Martin y Hooley, 1979; Poindron *et al.*, 1980a). Al contrario, si esta separación se realiza 24 a 48 horas después del parto la gran mayoría de las madres continúa siendo maternal al presentarle nuevamente a su cordero, inclusive con una separación de 24 horas (Poindron *et al.*, 1979).

En condiciones normales, el recién nacido se queda con su madre y eso permite el desencadenamiento completo y la consolidación de la CM después del periodo inmediato al parto. Con ello, se lleva a cabo el establecimiento de un *vínculo selectivo*, con el cual, la madre quien podría inicialmente manifestar comportamientos de aceptación hacia cualquier recién nacido, limita su conducta materna hacia la(s) cría(s) con la(s) cual(es) ha estado en contacto después del parto, es decir la(s) suya(s) en la mayoría de los casos. Esta relación preferencial rápidamente culmina en la aceptación exclusiva de dichas crías al amamantamiento. Una vez establecido este vínculo selectivo es muy poco probable que una madre acepte otra cría de manera espontánea. Al contrario, ella rechaza cualquier intento de succión por parte de otras crías con las cuales no ha estado en contacto, frecuentemente con conductas agresivas (por ejemplo golpes con la cabeza). Esta conducta de amamantamiento selectivo se establece dentro de las 2 a 4 horas post-parto (Poindron y Le Neindre, 1980), y puede ser evidenciada incluso desde los 30 min post-parto (Smith, Van-Toller y Boyes, 1966).

El intervalo en el cual la madre consolida su conducta maternal y establece el vínculo selectivo que le servirá para identificar y reconocer a su progenie es llamado "*periodo sensible o periodo crítico*" y se refiere al momento inmediatamente post-parto durante el cual ocurre el establecimiento de la conducta maternal (Hersher *et al.*, 1963). La existencia de un periodo sensible parece ser un elemento constante de la conducta maternal en la mayoría de los mamíferos estudiados hasta la fecha (Rosenblatt y Siegel, 1981). Fuera de este periodo sensible, la proporción de ovejas que muestran una conducta maternal es muy baja. Por ejemplo, se encontró que durante el estro (o mejor conocido como *celo*), alrededor del 20% de las ovejas se muestran receptivas a corderos recién nacidos (Poindron y Le Neindre, 1980). Así mismo, durante la mayor parte de la gestación no se presenta receptividad de neonatos a la ubre (Ver figura 1a).

3. Estro post-parto.

En varias especies, el comienzo de la actividad sexual se presenta a los pocos días después de haber parido la hembra, lo cual se conoce como estro post-parto, y la hembra puede ser fertilizada en ese momento. Así ocurre con los roedores (Conner y Davis, 1980). En el caso de las ovejas, cabras y vacas esta característica está ausente, lo cual se conoce como anestro post-parto, a pesar de que la secuencia hormonal de esteroides sexuales podría teóricamente promover la expresión de la receptividad

(Fabre-Nys y Martin, 1991). La combinación de varios factores (el fotoperíodo, la alimentación, las condiciones climáticas y la duración de la gestación) pueden influir para que el estro post-parto no se presente, debido al alto costo energético que representaría para la hembra un nuevo embarazo. La duración del periodo de reposo sexual post-parto también se ve influenciada por la duración de la lactancia ya que retrasa el inicio de la actividad gonadal post-parto y por consiguiente influye en el estado reproductivo de la madre (Gordon y Siegmann, 1991; Lahulou-Kassi, Berger, Bradford *et al.*, 1989). Este periodo de reposo sexual puede variar de acuerdo a la frecuencia de amamantamiento, ya que una elevada actividad de amamantamiento durante las primeras semanas de lactancia, retarda el inicio de la actividad sexual post-parto en ovejas (Fletcher y Lindsay, 1971; Louault, 1983). Por otro lado, cuando los corderos se destetan poco después del parto y las madres son sometidas a la ordeña, éstas inician nuevamente su actividad sexual más rápido que las hembras que permanecen amamantando a sus crías (Mauléon y Dauzier, 1965).

4. Factores fisiológicos involucrados en la facilitación de la CM en ovinos.

En la oveja, al final de la gestación aproximadamente entre los días 140 y 155 a partir de la fecha de fecundación (dependiendo de la raza), tiene lugar una serie de cambios hormonales. Por un lado, una dramática caída en los niveles circulantes de progesterona aproximadamente unos cinco días antes del parto, y por otro, un incremento súbito de los niveles de estradiol circulantes, que van de los 5 pg/ml en niveles basales hasta 300 pg/ml al momento del parto aproximadamente (Stabenfeldt, 1974; Terqui, 1974). Otro incremento en los niveles de estradiol, aunque no tan grande como en el momento del parto, se presenta cuando la hembra está en estro, alcanzando valor aproximado de 75 pg/ml. Ver figura 1b.

Se ha demostrado que existe una relación positiva entre el E2 y la conducta maternal. Estudios en hembras tratadas con altas dosis de estradiol, han comprobado que se puede inducir una conducta maternal en el 50% de las hembras tratadas o más, si estas son multíparas (Le Neindre, Poindron, Delouis, 1979; Poindron y Le Neindre, 1980; 1984). Así mismo, la duración del periodo sensible inicial de receptividad al recién nacido depende del estradiol: la inducción del parto por una inyección de una alta dosis de estradiol, resulta en niveles altos de esta hormona por más de 24 horas después del parto, (siendo que sin la inyección los niveles disminuyen rápidamente dentro de las 2-3 horas post-parto), lo cual promueve el mantenimiento de la receptividad maternal por mucho más que las 4 a 8 horas

normalmente observadas en el caso de un parto espontáneo o aun en el inducido por una inyección de dexametasona (Poindron *et al.*, 1979).

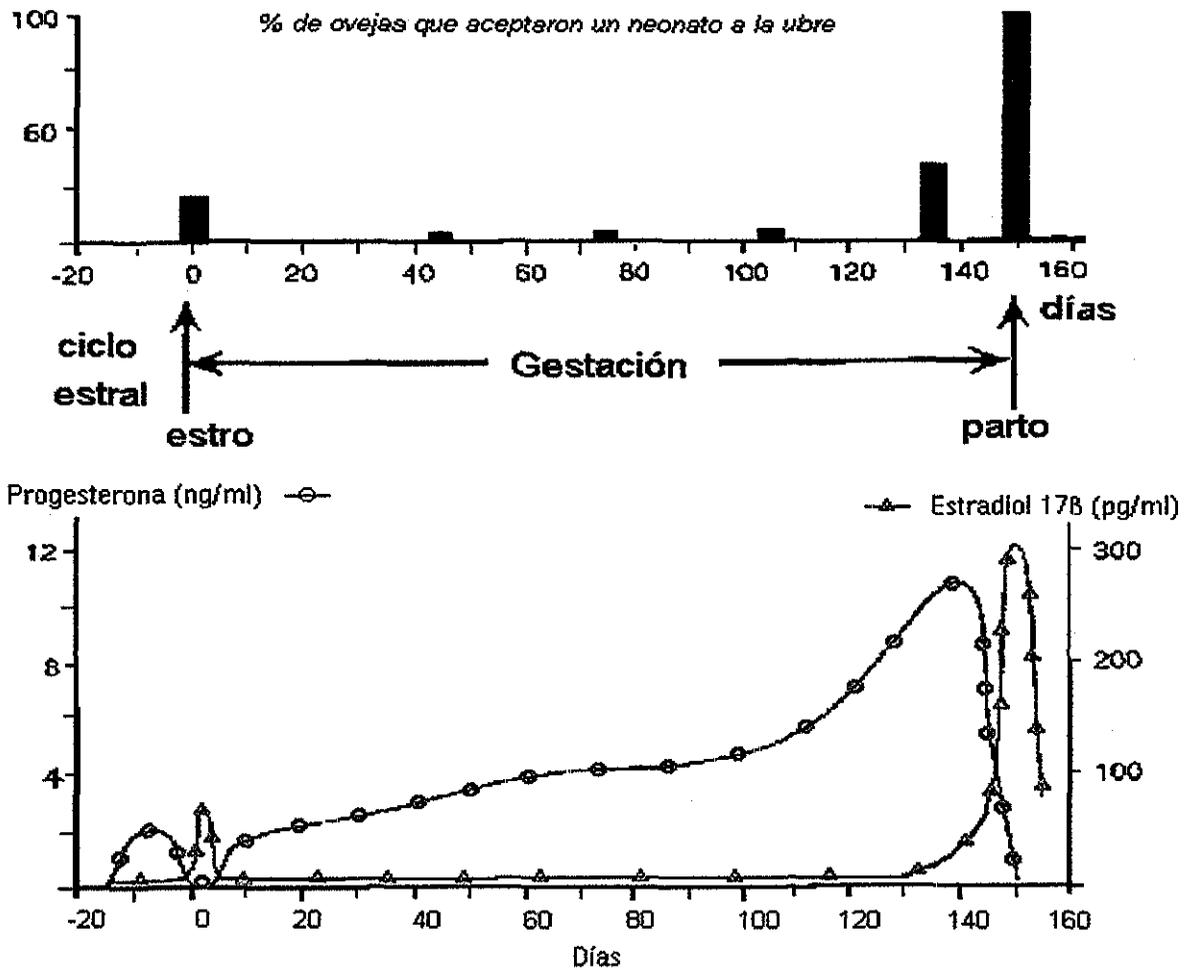


Fig. 1. En la figura superior se observa el porcentaje de ovejas que manifestaron receptividad a corderos recién nacidos, y en la figura inferior se observan las concentraciones plasmáticas del estradiol y progesterona en el mismo periodo. Adaptado de Poindron y Le Neindre, 1980.

Estos estudios también indicaron que dichos tratamientos hormonales no siempre inducen la conducta maternal de una manera estrecha e inmediata, al contrario de lo que ocurre al parto. De hecho, se requieren de dosis muy altas para obtener una buena respuesta (Kendrick y Keverne, 1991; Poindron y Le Neindre, 1980). Ello sugiere que otros factores son necesarios para una completa manifestación de la conducta maternal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En otras investigaciones se demostró que la estimulación vaginocervical (EVC) ocasionada por la expulsión del feto al nacer constituye un factor clave para una rápida y completa manifestación de la conducta maternal. Así, una EVC artificial de 5 minutos, aplicada a hembras no gestantes ni lactantes después de un tratamiento con estradiol y progesterona, conduce a la manifestación de la conducta maternal de una manera rápida y completa (Kendrick, Keverne, Hinton *et al.*, 1991; Kendrick y Keverne, 1992; Keverne, Lévy, Poindron *et al.*, 1983; Poindron, Lévy y Krehbiel, 1988). Esta acción facilitatoria de la EVC en el despliegue de la CM necesita de una preparación por el estradiol (Kendrick y Keverne, 1991; Poindron *et al.*, 1988). Por otra parte, en hembras parturientas, si la EVC causada por la expulsión del feto es bloqueada a través de una anestesia peridural, esto impide el despliegue de la conducta maternal, especialmente en hembras primíparas (Krehbiel, Poindron, Lévy *et al.*, 1987; Lévy, Kendrick, Keverne *et al.*, 1992).

Varios estudios han analizado el mecanismo de acción de la EVC; se ha demostrado que ésta ejerce su papel a través de la liberación intracerebral de oxitocina. Lo anterior concuerda con el hecho de que existe una secreción importante de esta hormona en el líquido cefalorraquídeo durante el parto, y también durante una estimulación vaginocervical artificial (Kendrick, Keverne, Baldwin *et al.*, 1986; Kendrick, Keverne, Hinton *et al.* 1991).

Así mismo, infusiones intracerebrales de OT y estudios por retrodiálisis han demostrado la capacidad de la OT para inducir la conducta maternal en ovejas no gestantes (Kendrick, Keverne y Baldwin, 1987) y también para contrarrestar el efecto inhibitor de la anestesia peridural (Lévy *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la acción de la OT es facilitada por los opioides y la hormona liberadora de corticotropina (Kendrick y Keverne, 1989; Keverne y Kendrick, 1991), mientras que la administración de naltrexona, antagonista de opioides, retrasa el inicio de la conducta materna en ovejas parturientas (Caba, Poindron, Krehbiel *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha encontrado que el dramático cambio en la preferencia olfatoria hacia los fluidos amnióticos al momento del parto (Lévy *et al.*, 1983) parece estar íntimamente asociado con los cambios fisiológicos ocurridos en ese momento – altos niveles de E2 y liberación de OT- en respuesta a la EVC (Lévy, Keverne, Poindron *et al.*, 1990; Poindron *et al.*, 1988).

Sin embargo, las estructuras sensibles al estradiol involucradas en la facilitación de la acción de la EVC a nivel cerebral y su relación con la liberación de OT, para el despliegue de la conducta maternal y el vínculo selectivo en la oveja aun se desconocen.

5. La importancia de la experiencia maternal previa.

a) La experiencia maternal en la rata.

En la rata, la experiencia maternal previa no es un requisito para la óptima expresión de la conducta maternal en el primer parto (Rosenblatt y Lehmann, 1963); sin embargo, el contacto con la cría durante el periodo sensible facilita la consolidación de la conducta materna no solo a corto plazo, sino también a largo plazo. Las madres primíparas que cuidan su progenie sólo durante los primeros dos días post-parto, muestran una CM con una latencia corta cuando se les presentan nuevamente a otras crías, varias semanas después. Esto significa que las madres pasan por un proceso de reforzamiento en el cual adquieren cierta experiencia de un fenómeno o evento dado y cuando este evento se le presenta nuevamente, responden con una latencia más corta que cuando se les presenta por primera vez. Por otro lado, cuando las madres primíparas son privadas del contacto con sus crías al momento del parto y también probadas varias semanas después, éstas responden pero con una latencia de aproximadamente 4 días (Bridges, 1975; 1977; Jakubowski y Terkel, 1985). Este efecto de la experiencia es también observado en hembras vírgenes cuando son expuestas a crías durante una semana a 10 días. Entonces, este proceso es una manera de adquirir experiencia materna sin involucrar factores endócrinos del parto. También, hembras vírgenes con este tipo de experiencia se muestran maternales ante nuevas crías con latencias de acercamiento y de alimentación más cortas que cuando se le presentan a crías por primera vez (Bridges *et al.*, 1977; Cohen y Bridges, 1981; Fleming y Rosenblatt, 1974). Sin embargo, la facilitación de la conducta maternal inducida por la experiencia es mayor en una hembra primípara con algunas horas de contacto madre-crías, en comparación con una hembra virgen con experiencia de sensibilización por varios días (Fleming y Sarker, 1990). En otros términos, el efecto de la experiencia materna es amplificado por el medio hormonal del parto. Yeo y Keverne (1986) por su parte, encontraron que en ratas tratadas con estradiol, la EVC mejora significativamente la proporción de hembras múltiparas que muestran conducta materna, mientras que en hembras nulíparas también tratadas con estradiol la EVC no facilita la inducción de conducta maternal.

b) La experiencia maternal en la oveja

La manifestación de la CM al parto difiere entre ovejas multíparas y primíparas. Le Neindre y colaboradores (1979) fueron los primeros en mencionar que existe una interacción entre hormonas y experiencia en el despliegue de la conducta maternal en la oveja. En su experimento, el 50% de las hembras multíparas respondieron maternalmente a un tratamiento hormonal de progesterona y estradiol inicialmente diseñado para inducir la lactancia. Sin embargo, este mismo tratamiento fue inefectivo para inducir la conducta maternal en hembras vírgenes. Esto es apoyado también por el hecho de que la respuesta maternal a los neonatos puede ser observada en hembras multíparas de 10 a 15 días pre-parto (Alexander, 1960; Poindron y Le Neindre, 1980), mientras que este no es el caso en hembras nulíparas (Raksanyi, 1979). Esta respuesta se relaciona con el inicio de una producción significativa de E2 circulante por la placenta en las últimas dos semanas pre-parto, como se mencionó anteriormente. Experimentos posteriores intentaron aclarar si la acción facilitatoria de los estrógenos dependía de la maduración fisiológica asociada con el parto o si era necesaria la experiencia maternal del cuidado del cordero. Los resultados indicaron que un solo ciclo de cuidado parental no parece ser suficiente para que hembras no gestantes pudieran responder a un tratamiento de inducción por el estradiol. En algunos casos, trabajando con hembras adultas con experiencia de un gran número de partos y ciclos maternales (crianza de corderos) la respuesta maternal ha sido observada en ausencia de cualquier tratamiento (Poindron *et al.*, 1984).

Por otro lado, los efectos de la EVC varían con la experiencia. En la mayoría de las ovejas primíparas (90%), la supresión de la estimulación genital al parto por una anestesia peridural detiene el despliegue de la conducta maternal (Krehbiel, Poindron, Lévy *et al.*, 1987). Por el contrario, si la anestesia peridural se aplica en hembras multíparas esta privación tiene un efecto solamente en el 50% de las madres. La EVC facilita la CM en multíparas (Keverne *et al.*, 1983 ; Poindron *et al.*, 1988) mientras que el efecto es más difícil de observar en hembras nulíparas (Kendrick y Keverne, 1991).

En conclusión, la experiencia de interactuar con la cría durante el periodo sensible es muy importante para la consolidación de la conducta maternal en la borrega y la duración de este periodo depende de las altas concentraciones de E2 circulante. Así mismo, el efecto facilitador del estradiol y de la EVC para inducir la conducta materna también se incrementan con el número de partos y/o experiencia maternal.

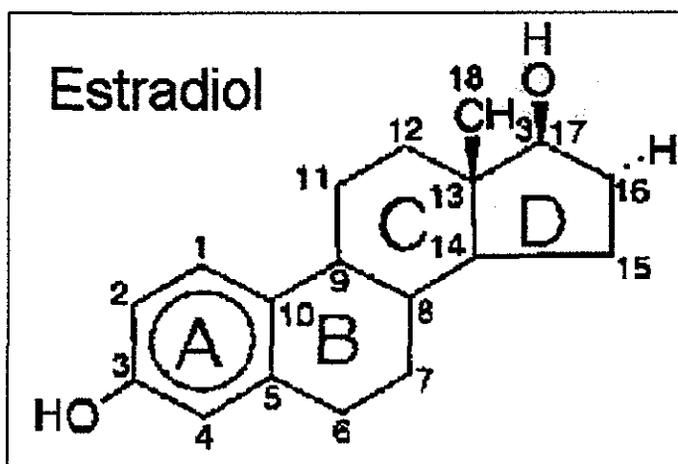
B. MECANISMOS DE ACCION DEL ESTRADIOL

1. El estradiol (breve reseña)

Los primeros estudios acerca del estradiol datan de 1925, cuando Loewe y colaboradores informaron por primera vez de la existencia de una hormona sexual femenina en la sangre de hembras de diversas especies. En el mismo año (Frank *et al.*, 1925), se detectó un principio sexual activo en sangre de cerdas en estro. Sin embargo, el descubrimiento realizado por Loewe y Langue en 1926 tuvo mayor importancia; se trataba de una hormona en orina de mujeres ciclando, cuya concentración variaba dependiendo de la fase del ciclo menstrual. Posteriormente, Zondek (1928), detectó grandes cantidades de esta hormona en la orina de mujeres embarazadas, lo cual sirvió para que los químicos de esa época aislaran esta sustancia en forma de cristal (Butenandt, 1929; Doisy *et al.*, 1929, 1930) y así poder dilucidar la estructura química de lo que hoy conocemos como estradiol.

A pesar de ello, no fue sino hasta la década de 1960 cuando Jensen y Jacobsen (1962) sugirieron la presencia de receptores intracelulares para estrógenos en tejidos blanco tales como el hígado, huesos, endotelio vascular, corazón, aparato reproductor femenino y sistema nervioso central. Esto tuvo importancia histórica porque fue la primera demostración de la existencia de receptores de la familia de hormonas esteroideas, y porque además proporcionó los métodos experimentales para identificar receptores similares para otras hormonas esteroideas (Jensen y DeSombre, 1972).

Dentro de la familia de los estrógenos, el estrógeno natural más potente y el que se encuentra en mayor cantidad es el 17 β -estradiol, seguido por la estrona y el estriol (es por ello que frecuentemente mencionamos al estradiol para referirnos a los estrógenos en general). Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos que contienen un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (ver figura 2). El anillo fenólico A es la principal característica estructural de la cual depende la unión selectiva y de la alta afinidad a receptores de estrógenos (Duax *et al.*, 1988; Jordan *et al.*, 1985).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Estructura molecular del estradiol. (Tomado de Williams y Stancel, 1998).

2. El estradiol y su receptor

Los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de la regulación en la expresión de genes. Estas hormonas se difunden de modo pasivo a través de membranas celulares y se unen a un receptor, localizado principalmente en el núcleo (Evans, 1988).

El receptor a estrógenos (o estradiol, RE2) parece estar codificado por un gen único, y el receptor tiene una masa molecular de aproximadamente 66,000 Daltons con un sitio único de unión a hormona. El receptor interactúa con secuencias de nucleótidos específicas denominadas *elementos de reacción a estrógenos (ERE)* presentes en genes blanco, y esta interacción incrementa, o en algunas situaciones disminuye, la transcripción de genes específicos. Además de los elementos de reacción a estrógenos, muchos genes contienen elementos que median acciones de otros factores reguladores. Esto puede proporcionar un mecanismo mediante el cual las señales provenientes de estrógenos y de otros compuestos convergen en sitios genómicos comunes para integrar respuestas celulares a múltiples estímulos y consecuentemente alteraciones en la función celular (Power *et al.*, 1992).

De manera general, el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la actividad “genómica” del receptor es el siguiente: éste posee una región o dominio separado para la unión a hormonas, un dominio para la unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) y otros dos dominios que participan en la activación transcripcional. El complejo estrógeno-receptor se une al ADN y estabiliza un complejo de múltiples proteínas que incluyen ácido ribonucleico (ARN) polimerasa y otras proteínas necesarias para el inicio de la síntesis de ARN de otras proteínas (Tsai y O'Malley, 1994. Figura 3).

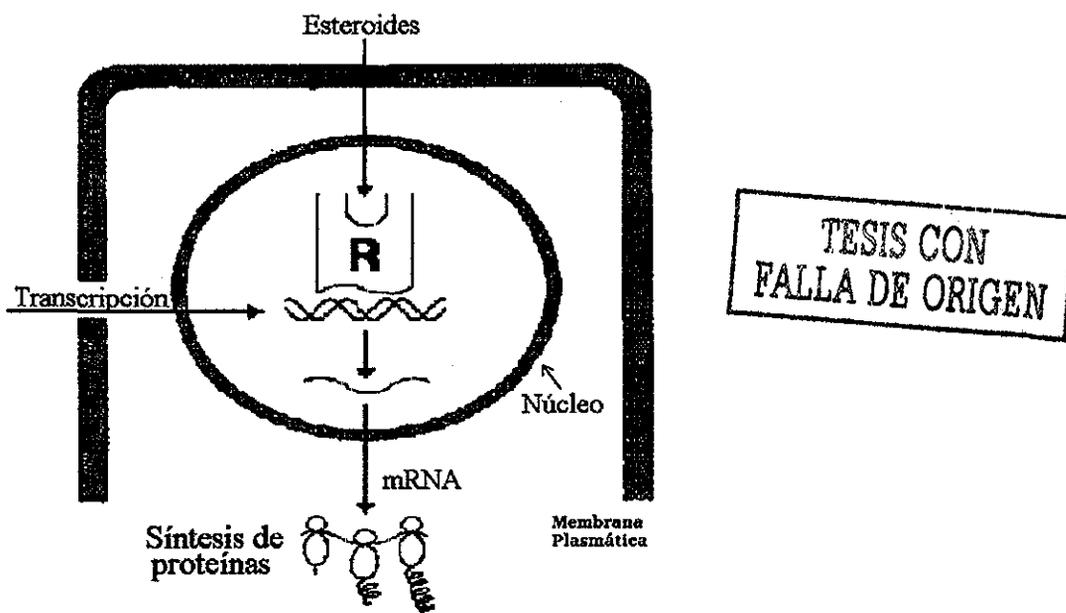


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de los estrógenos sobre su receptor para la síntesis de proteínas. (Tomado de Baulieu y Kelly, 1990).

Por otro lado, se ha encontrado que los RE2 están predominantemente localizados en el núcleo, aunque también pueden existir en el citoplasma celular. No se conoce exactamente cual es la diferencia entre los receptores citoplasmáticos y los receptores nucleares. Sin embargo, se ha demostrado que el E2 incrementa la afinidad del receptor nuclear por la cromatina (King y Greene, 1984; Welshons, Lieberman y Gorski, 1974) y esto permite la interacción entre receptor y el mecanismo de transcripción de genes.

También existen las acciones “no genómicas” de las hormonas esteroides, que se caracterizan porque no involucran cambios en la expresión de genes y tienen lugar en el citoplasma celular. Además, a diferencia de las “genómicas” se producen relativamente más rápido. En este caso, ocurre una serie de eventos que involucran a proteínas G y/o a segundos mensajeros que de manera indirecta pueden regular la expresión de genes. De aquí parte el principio de la coparticipación de otras sustancias como por

ejemplo ciertos neurotransmisores que pueden actuar sobre el núcleo de células que solo tienen receptores a esteroides a nivel de la membrana celular (Orchinik y McEwen, 1995).

En neuronas, también se han encontrado receptores a nivel del núcleo y en sus proyecciones (dendritas y axones), las cuales poseen el sustrato neuroanatómico para los efectos del estradiol (Pfaff, 1980).

Un ejemplo de ellas, son las neuronas liberadoras de gonadotropinas o GnRH en el hipotálamo. La actividad de estas neuronas es regulada por esteroides, y en células *in vivo* no se ha encontrado que estas células expresen receptores a estradiol (Shivers, Harlan y Morrel, 1983) o a progesterona en las especies estudiadas (Herbison y Theodosis, 1992; Thind y Goldsmith, 1997; Warembourg *et al*, 1998). Sin embargo, distintas poblaciones de células adyacentes inmunorreactivas a neurotensina (Herbison y Theodosis, 1992), galanina (Horvath *et al*, 1997), ácido gamma-aminobutírico (GABA) o glutamato expresan receptores a estradiol (Thind y Goldsmith, 1997). Estos hallazgos muestran una regulación indirecta de la liberación de GnRH por estrógenos.

3. Técnicas de visualización de los receptores a estradiol en el cerebro.

Para entender los procesos moleculares y celulares por medio de los cuales los esteroides pueden llegar a modular una conducta es importante conocer los sitios de acción de estas hormonas.

A partir de los años 60's se comenzaron a estudiar las zonas cerebrales que contienen esteroides. Los primeros trabajos en el cerebro así como en el útero fueron realizados por autoradiografía con ayuda del E2-tritiado (^3H -estradiol, utilizado como trazador radioactivo) el cual facilitaba la localización de los sitios en los que se encontraba su receptor (Pfaff y Keiner, 1973; Stumpf y Sar, 1975; Warembourg, Jolivet y Milgrom, 1989).

En el cerebro de la rata, los receptores a estradiol y a progesterona se localizaron por medio de autoradiografía en estructuras tales como la amígdala medial, el hipocampo, la corteza, locus cerúleos, el núcleo dorsal del raphé, cerebro medio y cerebelo, aunque la densidad de RE2 en estas últimas regiones fue muy baja y difusa en comparación con las estructuras hipotálamicas, como se detalla posteriormente (McEwen y Alves, 1999).

Hacia los años 80's, el aislamiento y la secuenciación de receptores a esteroides permitieron la obtención de anticuerpos dirigidos contra esas moléculas. Al mismo tiempo, dichos anticuerpos permitieron la detección de sus receptores sobre cortes de tejido, y gracias al empleo de técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ) fue más fácil lograr su ubicación en el cerebro.

La inmunohistoquímica abarca un gran número de técnicas que de manera general se basan en la sensibilidad y especificidad de determinados marcadores, los cuales permiten detectar moléculas específicas por medio de anticuerpos. Estas técnicas se han empleado en la identificación de mensajeros químicos como neurotransmisores, aminoácidos, péptidos y hormonas (Silverman, 1994).

Gracias al empleo de anticuerpos monoclonales y al empleo de técnicas como la IHQ, la presencia de los RE2 fue confirmada en las regiones descritas anteriormente por autoradiografía (Fuxe *et al.* 1986 en rata; Blaustein y Turcotte, 1989; DonCarlos *et al.* 1991 en cobayo; Bayliss *et al.*, 1986 en gato; Lehmann *et al.*, 1993 en oveja).

Algunas de las ventajas importantes de la IHQ sobre la autoradiografía son: a) la inmunorreactividad de los RE2 puede ser detectada independientemente de la presencia del ligando endógeno. b) En esta técnica, los experimentos pueden ser realizados más rápidamente debido a que los estudios de autoradiografía requieren de grandes tiempos de exposición y c) se evita el uso de la radioactividad para llevarla a cabo.

C. Estructuras centrales involucradas en el control de la conducta maternal.

La mayor parte de lo que se conoce sobre estructuras cerebrales relacionadas con el control y despliegue de la conducta maternal ha sido por experimentos realizados principalmente en roedores (Numan, 1994; Sheehan, Cirrito, Numan *et al.*, 2000). La mayoría de los experimentos han consistido en lesionar con sustancias químicas, realizar implantes hormonales, deaferentar regiones, zonas o núcleos, estimular eléctricamente núcleos o vías neurales, o localizar receptores, agentes neuroquímicos y activación genómica temprana (c-fos).

Sin embargo, en comparación con la rata, existen pocos trabajos relacionados con el control neurobiológico de la CM en la oveja (Da Costa, Guevara-Guzman, Ohkura *et al.*, 1996; González-Mariscal y Poindron, 2002; Kendrick *et al.*, 1992, 1997; Lévy *et al.*, 1996; Krehbiel *et al.*, 1987; Poindron *et al.*, 1988). En estudios por microdiálisis para la determinación de OT, se han encontrado varias estructuras cerebrales relacionadas con el control de la CM en la oveja, estas estructuras son: el área preóptica media, el núcleo paraventricular (Lévy *et al.*, 1996), el núcleo supraóptico, el núcleo comisural anterior (NCA), el núcleo base de la stría terminal, y los bulbos olfatorios (OB) como lo mencionan Kendrick *et al.* (1986; 1988a-b; 1992d, 1997)

Las principales regiones involucradas en la regulación de la conducta maternal son las siguientes:

1. Área Preóptica Media (APOM)

Los resultados obtenidos en varios tipos de experimentos indican que el área preóptica media es la estructura más importante para el control de la conducta maternal en la rata (Numan, 1977, 1984, 1994). El APOM se une rostralmente a la banda diagonal de Broca (BDB) y caudalmente al hipotálamo anterior. Lateralmente se une al área preóptica lateral (APOL) y dorsalmente al NBST y a la comisura anterior (CA).

Lesiones electrolíticas realizadas en ratas lactantes producen una inhibición en la actividad de cuidado de las crías, en la construcción del nido y en la conducta de amamantamiento (Jacobson, Terkel, Gorski y Sawyer, 1980; Numan, 1974; Numan *et al.*, 1988). Más aun, la destrucción selectiva de los cuerpos celulares del APOM con el ácido N-metil-DL-aspartico interrumpe la actividad de la

construcción del nido, cuidado y conducta de amamantamiento (Numan, 1988, 1990a, b). Así mismo, se han empleado técnicas que cortan las vías aferentes y eferentes hacia el APOM (Franz, 1986; Miceli, 1983; Numan, 1974, 1980, 1985) y estos estudios sugieren que al ser dañadas las proyecciones del APOM, se interrumpe la conducta maternal.

El APOM es uno de los sitios donde el estradiol y la prolactina actúan para facilitar la conducta maternal en la rata. Implantes de estradiol en el APOM facilita la conducta maternal en ratas vírgenes (Bridges, Numan, Ronsheim *et al.*, 1990; Numan, *et al.*, 1977), mientras que la aplicación de antiestrógenos la inhibe (Ahdieh, Mayer y Rosenblatt, 1987). En la coneja, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren un papel similar de esta estructura (Caba, Beyer, González-Mariscal *et al.*, 2001; González-Mariscal y Poindron, 2002).

Por otra parte, en estudios por autoradiografía (Pfaff y Keiner, 1973; Stumpf *et al.*, 1968, 1970, 1975), de los sitios de unión a receptor (Brown, 1988; Rainbow, Parson y McEwen, 1982) y en estudios por inmunohistoquímica (Fleming *et al.*, 1994; Fahrbach *et al.*, 1986; Giordano, Siegel y Rosenblatt, 1989; Giordano, Ahdieh, Mayer *et al.*, 1990; Jacobson *et al.*, 1980; Koch y Ehret; 1989; Wagner *et al.*, 1996; Numan, 1990; Sar y Parikh, 1986), se ha demostrado la presencia de receptores a estradiol en esta área en relación con la conducta maternal en la rata.

En la oveja, la presencia de RE2 en esta estructura en relación con la CS y la ovulación está bien establecida (Blache *et al.*, 1994; Herbison *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1993). Sin embargo, la presencia de estos receptores y su relación en el control de la conducta materna no ha sido estudiada.

En relación con la experiencia maternal y los cambios neurobiológicos que se presentan en el cerebro, se ha encontrado que en ratas, el número de RE2 muestra un incremento significativo al final de la gestación (Giordano *et al.*, 1989; 1990). También se ha encontrado que el número de células inmunorreactivas al RE2 en esta estructura varía entre las diferentes etapas de la gestación (Wagner *et al.*, 1996). Además, en el ratón se ha demostrado que la concentración de los RE2 en el APOM aumenta con respecto a la experiencia maternal previa (Ehret y Buckenmaier, 1994; Koch, 1990).

b. Amígdala Medial (AM)

Se ha descrito que la amígdala juega un papel inhibitorio dentro del control de la conducta maternal. Fleming y cols. (1980) demostraron que lesiones en la amígdala medial en ratas hembras vírgenes facilitan la respuesta al cuidado de las crías. Por otra parte, animales expertos maternalmente que recibieron estimulaciones eléctricas en la amígdala mostraron más rápidamente una CM hacia las crías que los animales no estimulados (Morgan, Watchus, Milgram *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que los animales que recibieron lesiones en la amígdala son menos neofóbicos que los controles es decir, aceptan más rápidamente a las crías, las cuales representan un nuevo estímulo para la hembra.

La amígdala medial recibe proyecciones del órgano vomeronasal y la facilitación de la CM en hembras vírgenes con lesiones en la amígdala es equivalente a lo observado en hembras vírgenes con un daño selectivo en los nervios vomeronasales (Fleming, Vaccarino, Tambosso *et al.*, 1979). En referencia al órgano vomeronasal y su conexión con la amígdala, éste proyecta al bulbo olfatorio accesorio, el cual proyecta a la amígdala medial. Así mismo, la amígdala medial proyecta por medio de la stría terminalis al núcleo base de la stría terminal y al APOM. EL núcleo base de la stría terminal por su parte, también tiene proyecciones al APOM (Figura 4).

También se han encontrado RE2 en la amígdala medial en el cerebro de ratones (Koch y Ehret, 1989) y ratas (Warger *et al.*, 1996) en relación con la CM y experiencia maternal. Lehmann (1993) reportó células inmunopositivas a RE2 en la amígdala y en el hipocampo de la oveja.

c. Núcleo base de la stría terminal (NBST) y septum

El NBST y el septum se han relacionado con el completo desarrollo de la CM, debido a que lesiones de estas áreas en ratas (Fleischer y Slotnick, 1978; Terlecki y Sainsbury, 1978), ratones (Carlson y Tomas, 1968, Slotnick y Nigrosh, 1975) y conejas (Cruz y Beyer, 1972) provocan una desorganización espacial de la CM. Las madres toman a sus crías para transportarlas a otro lugar (conducta de acarreo) pero colocan a cada una de ellas en sitios diferentes. De igual forma, la construcción del nido no resulta ser la adecuada por el tamaño del nido o la construcción en sí. De manera general, lesiones en estos sitios no interrumpen la CM, pero sí causan una alteración en ella.

Por técnicas de IHQ se han encontrado receptores a estradiol en estas área y su presencia ha sido relacionada con el control tanto de la conducta sexual (rata: Hui-Yun li *et al.*, 1993; oveja: Blache, 1994) como de la conducta maternal (rata: Wagner *et al.*, 1996).

En la oveja, durante la lactancia, al final de la gestación y en tratamientos con estradiol y progesterona (Lehmann *et al.*, 1993), también se encontró un incremento significativo de células inmunoreactivas a OT en el NBST.

d. Núcleo Paraventricular (NPV).

El NPV es la fuente principal de redes neurales oxitocinérgicas dentro del cerebro (Broad, Lévy, Evans *et al.*, 1999; Caba, Silver, González-Mariscal *et al.*, 1996; Da Costa *et al.*, 1996; Giovenardi, Padoin, Cadore *et al.*, 1997, 1998; Sofroniew, 1985) y como se mencionó anteriormente, la OT juega un papel importante en el despliegue de la CM. Por otra parte, existen evidencias de proyecciones recíprocas entre el APOM y el núcleo paraventricular (Conrad y Pfaff, 1976; Sawchenco y Swanson,

1983). Quizá las proyecciones del APOM hacia el NPV activan vías neurales oxitocinérgicas en este núcleo en relación con la conducta maternal. Numan y Corodimas (1985) presentaron evidencias de que estas proyecciones no están involucradas en el control de la conducta maternal en ratas lactantes, pero en este estudio, las hembras recibieron lesiones durante el periodo post-parto, después de que la conducta maternal estaba bien establecida. Por otro lado, en algunos experimentos se realizaron cortes de las conexiones laterales del APOM y sí irrumpieron la CM (Moigan *et al.*, 1999).

Se han encontrado neuronas oxitocinérgicas en regiones cerebrales que reciben información del sistema olfatorio principal y/o vomeronasal. Estas regiones incluyen al NBST, el núcleo olfatorio anterior y el tubérculo olfatorio (De Kloet, Voohuis, Boschma *et al.*, 1986). Numan (1990) menciona que es posible que el sistema oxitocinérgico incremente su actividad al hacer relevo en el NPV, modificando con ello, la función olfatoria/vomeronasal al momento del parto, y de esta forma se facilita el despliegue de la conducta maternal

Durante el parto en la oveja, existe una liberación de oxitocina en el NPV, bulbo olfatorio y área preóptica. Sin embargo, estudios por retrodiálisis de OT en el núcleo paraventricular han permitido la inducción de la conducta maternal, mientras que infusiones en el APOM reduce solamente las conductas de rechazo hacia el cordero. (Da Costa *et al.*, 1996). El parto o la EVC activan al núcleo paraventricular y tanto neuronas oxitocinérgicas como sus receptores se han encontrado en este núcleo (Kendrick *et al.*, 1997). También se ha demostrado que el número de neuronas inmunoreactivas a oxitocina se incrementa al momento del parto o después de una exposición previa con estradiol y/o progesterona (Broad *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1993). De igual forma, la experiencia maternal previa incrementa la expresión del ARNm de oxitocina en el NPV (Broad *et al.*, 1999).

Por otra parte, en estudios por inmunohistoquímica se ha encontrado que tratamientos con estrógenos incrementan el número de células que contienen oxitocina en el cerebro de la rata (Jirikowski, Caldwell, Stumpf *et al.*, 1988); además incrementa el número de receptores a oxitocina (Coirini, Johnson, McEwen, 1989; De Kloet Voorhuis y Elands, 1985). Se sabe también que los esteroides modifican la expresión del gen de oxitocina en el cerebro de la rata (Caldwell, Brooks, Jirikowski *et al.*, 1989; Miller, Ozimek Milner *et al.*, 1989).

Axelson y cols (1990) encontraron que los RE2 en el cerebro de la rata, se co-localizaron con células inmunoreactivas a vasopresina en las células magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico, lo cual sugiere que el estradiol influye directa o indirectamente sobre las células magnocelulares de los núcleos hipotalámicos.

e. Núcleo Supraóptico (NSO)

Aunque este núcleo no está directamente relacionado con la expresión de la conducta maternal, se sabe que es uno de los núcleos oxitocinérgicos más importantes del hipotálamo. Las neuronas magnocelulares liberadoras de oxitocina y vasopresina presentes dentro de los núcleos supraóptico y paraventricular también tienen un papel muy importante dentro de la mantención de homeóstasis y dentro de algunas funciones reproductivas. En la hembra, las fluctuaciones en las concentraciones de estrógenos en la sangre alteran las concentraciones de oxitocina en plasma (en rata: Yamaguchi *et al.*, 1979; en humano: Amico *et al.*, 1981). También, se observan altos niveles de OT circulante dentro de un ciclo estral normal cuando los niveles de E2 son igualmente altos (Sarkar y Gibbs, 1984). Durante la lactancia, se ha sugerido que el E2 está involucrado en la regulación de arreglos ultraestructurales de la glia dentro del NSO. Por otra parte, el E2 es importante para que las neuronas liberadoras de vasopresina respondan correctamente a un estímulo osmótico. La elevación de la secreción de vasopresina y la expresión del ARNm seguida de un estímulo hiperosmótico solo ocurre en presencia de E2 (Crowley y Amico, 1993).

Se ha encontrado que durante el parto y la última etapa de la gestación, los niveles de ARNm de OT se incrementan en los núcleos paraventricular y supraóptico. De igual manera, se ha encontrado un incremento en el número de receptores a oxitocina en éste núcleo y en el núcleo paraventricular en ovejas con experiencia maternal (Broad *et al.*, 1999). Por tanto, se considera que la experiencia maternal puede aumentar la liberación de este péptido en sitios que regulan la expresión de la CM.

Voisin y cols. (1997) también encontraron que las neuronas del NSO expresan el RE2, y que el E2 puede regular las neuronas magnocelulares liberadoras de oxitocina y de vasopresina de manera indirecta, por medio de una regulación trans-sináptica. La predominancia de RE2 en el área preóptica y

su conexión con el núcleo supraóptico sugiere que la acción del E2 en las neuronas magnocelulares puede modular el balance de fluidos y algunas funciones reproductoras.

f. Hipotálamo medio basal (HMB)

La importancia del HMB dentro de la conducta maternal radica en que esta estructura presenta algunos cambios en relación con el número de RE2 en la etapa de transición de la conducta maternal a la conducta sexual, lo cual (como hemos visto) se conoce como estro post-parto. Considerando que en la oveja no existe un estro post-parto, esta estructura es un buen control de las variaciones de estos receptores en estructuras no involucradas en la CM.

Wagner y cols (1996) reportaron un incremento en el número de células IR-RE2 en el hipotálamo medio basal, el cual fue significativamente más alto en el día 22 que en los días 8 y 16 de gestación. Estos resultados mostraron una regulación específica regional y temporal de los receptores a estradiol en el cerebro durante la gestación. Los cambios en los niveles de RE2 en regiones como el APOM y el HMB podrían indicar el cambio que tiene la expresión de la conducta maternal hacia una conducta sexual en una especie como la rata, y que ocurre después del momento del parto.

Esto confirma los estudios por autoradiografía (Pfaff y Keiner, 1973; Stumpf, 1968, 1975) inmunohistoquímica (Cintra, *et al.*, 1986; Sar y Parikh, 1986; Koch y Ehret, 1989) y de hibridación *in situ* (Lauber *et al.*, 1990, 1991; Simmerly *et al.*, 1990; 1991), que también han demostrado la presencia de receptores a estradiol o su ARNm en el hipotálamo medio basal.

Como hemos visto, la acción del estradiol se acompaña por lo general de un aumento en el número de receptores, tanto de receptores a él mismo como de receptores a otros compuestos, como por ejemplo la oxitocina y vasopresina. Así mismo, se acompaña de un incremento en el número de células inmunoreactivas a RE2 en relación con la experiencia maternal, como en el caso de los ratones.

Para estudiar cuales áreas sensibles al estradiol están involucradas en la activación de la CM en la oveja, podemos realizar un análisis de la variación del número de células con RE2 en las áreas que se han encontrado están relacionadas con la expresión de la CM en otras especies, y compararlas con aquellas áreas involucradas en la CS (apoyándonos en estudios en la oveja y en otras especies). Para

ello, nuestro grupo control sería un grupo al *Estro* en donde tenemos presencia de estradiol pero no de conducta materna, y nuestro grupo experimental un grupo de animales al momento del parto cuando hay estradiol y conducta maternal, pero no conducta sexual.

Por otro lado, es importante comprobar si el número de partos previos (**NPP**) en la oveja puede alterar el número de células IR, como ocurre en los roedores, lo cual permitiría averiguar si la mayor eficacia a la acción del E2 para activar la CM en hembras con experiencia, pueda depender de un mayor número de células positivas al RE2 en ovejas multíparas.

III. JUSTIFICACION

La justificación de este trabajo se puede resumir en los siguientes puntos:

1.- El estradiol es indispensable para la facilitación de la conducta materna al parto en la oveja. En particular es necesario para que la EVC pueda tener un efecto completo.

2.- El efecto de estos factores fisiológicos (E2 y EVC) aumenta con la experiencia maternal y/o el número de partos previos.

3.- En otras especies, esta experiencia está asociada a una mayor cantidad de células inmunopositivas al RE2.

4.- Por consiguiente, en la oveja existe la posibilidad de que la mayor eficacia en la respuesta al E2 y a la EVC para inducir la CM, dependa de un mayor número de células inmunopositivas a RE2.

5.- Sin embargo, en la oveja, las estructuras cerebrales responsables de la acción del E2 sobre la CM se desconocen.

6.- Por tanto, investigaremos si en las ovejas parturientas existen cambios en el número de células inmunorreactivas en zonas del cerebro susceptibles de participar en la facilitación de la CM, considerando que un cambio en el número de células marcadas en alguna estructura podría ser un indicador de la participación de dicha zona en la activación de la CM. Como control, se utilizará la condición del *Estro* en la cual hay presencia del estradiol pero no de conducta materna, y la estructura del hipotálamo medio basal, en la cual no deberían observarse cambios similares.

7.- Así mismo, investigaremos si existen diferencias en el número y distribución de células inmunomarcadas en relación con el NPP (lo cual implica una experiencia tanto fisiológica como conductual), comparando su expresión en hembras que paren por primera vez y en hembras que han parido al menos dos veces anteriormente.

IV. HIPOTESIS

1) Existen estructuras cerebrales que presentan un cambio en el número de células inmunopositivas al momento del parto, cuando se activa la conducta materna. Este número se espera sea diferente del encontrado al estro, cuando hay presencia de estradiol, pero no hay expresión de dicha conducta. Las estructuras que estudiaremos son el APOM, el NPV y la AM dada su importancia en el control de la CM al momento del parto en roedores y ovinos. Al contrario, en el HMB, estructura que supuestamente no está involucrada en dicha conducta, estos cambios deberían estar ausentes o ser a lo menos diferentes, ya que la presencia de un estro post-parto es excepcional en esta especie.

2) Se espera que existan diferencias en el número de células IR-RE2 entre el grupo al estro y el grupo al parto, dado que se trata de dos conductas diferentes y esto pudiera modificar la interacción y/o activación de las células inmunopositivas con el E2. El número de neuronas marcadas debería ser mayor al parto que al estro en las estructuras involucradas en la conducta materna (APOM, NPV, NSO y posiblemente AM), mientras que la situación debería ser opuesta en el HVM.

3) En hembras múltiparas, el número de células inmunoreactivas a los RE2 será mayor al encontrado en ovejas nulíparas.

V. OBJETIVOS

A) GENERAL

Determinar por técnicas de inmunohistoquímica la localización de receptores a estradiol en el cerebro anterior de ovejas parturientas y su posible variación en relación con el número de partos.

B) ESPECÍFICOS

1. Se buscará la presencia de RE2 en las siguientes regiones hipotalámicas conocidas por estar involucradas en la conducta maternal: área preóptica media, núcleo supraóptico, núcleo paraventricular y amígdala medial.
2. Se analizarán las posibles diferencias en la inmunorreactividad de estos receptores en ovejas parturientas múltiparas y en parturientas nulíparas.
3. Se compararán estos resultados con los obtenidos en hembras en *Estro*, el cual será nuestro grupo control. En todos los grupos no solo se analizarán las estructuras ya mencionadas, sino también el HMB por estar involucrado en la expresión de la conducta sexual, pero no de la conducta maternal.

VI. ANIMALES, MATERIALES Y METODOS

Este proyecto fue realizado en una colaboración (Proyecto de investigación ANUIES-ECOS # M98-S04) con el Dr. Frédéric Lévy y la Ing. Maryse Meurisse del Laboratorio de Comportamiento Animal (PRMD, URM CNRS-INRA-Universidad de Tours No. 6073) del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) en Nouzilly, Francia. En este instituto se colectaron tejidos de aproximadamente la mitad de los grupos (ver detalles a continuación). Esta colaboración facilitó la rápida obtención de los animales y un avance significativo en el análisis de los datos.

A. Animales

En México, el mantenimiento de los animales y la colecta de los cerebros se realizó en el Rancho Amazcala (Municipio del Marqués, Qro.) en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde el Centro de Neurobiología de la UNAM posee un hato de aproximadamente 70 animales. Dichas instalaciones cuentan con la infraestructura necesaria para el cuidado y mantenimiento de los animales. Las razas utilizadas fueron: Columbia y Rambouillet.

En relación con los animales obtenidos en Francia, estos fueron criados en las instalaciones del Rancho Experimental del INRA en Nouzilly Francia, bajo condiciones de manejo intensivo similares a las de México. Se utilizaron animales de cruza de las razas Ile-de-France, Préalpes y Romanov.

Se utilizaron en total 34 ovejas, entre 1 y 5 años de edad y con un peso promedio de 55 kg, las cuales fueron distribuidas en los siguientes grupos:

- 1) Hembras Nulíparas al *Estro* (n=7): hembras jóvenes entre 1 y 2 años de edad, sin experiencia previa de parto y sacrificadas 15 a 30 min. después del inicio del estro conductual.
- 2) Hembras Multíparas al *Estro* (n=8): hembras de más de dos años de edad, con experiencia previa de al menos dos partos y sacrificadas 15 a 30 min. después del inicio del estro conductual.

- 3) Hembras Nulíparas al *Parto* (n=9): hembras jóvenes entre 1 y 2 años de edad, sin experiencia previa de parto, sacrificadas entre 15 y 30 min. después del parto.
- 4) Hembras Multíparas al *Parto* (n=10): hembras adultas (de más de tres años), con al menos dos partos previos y sacrificadas entre 15 y 30 min. después del parto.

B. Tratamientos Generales

Todas las ovejas se trataron con esponjas intravaginales para sincronizar su ciclo estral. Las esponjas contenían un progestágeno (45 mg de acetato de fluorogestona, Chrono-gest®) para inducir una fase lútea. Estas esponjas permanecieron durante 14 días completos. En éste día, la esponja fue retirada e inmediatamente se inyectaron intramuscularmente 400 unidades internacionales (U.I.) de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, Folligón Intervet®) para inducir el estro, que se presentó 48-60 horas posteriores al suministro de ésta.

1) Grupo al *Estro*.

Para los animales del grupo al *Estro*, se tomó en cuenta la aceptación del macho a la monta, esto es, se introdujo al macho en un corral de prueba junto con la hembra algunas horas (4 a 8) antes del inicio del estro. En la aceptación del macho a la monta, la hembra permaneció sin moverse, facilitándole al macho a lo menos dos montas completas con intromisión y eyaculación. Posteriormente, la hembra fue sacrificada después de 15 a 30 minutos.

2) Grupo al *Parto*.

Para los animales del grupo al *Parto*, de la misma manera que el grupo anterior, se introdujo el macho al corral y se verificó la monta efectiva y eyaculación. A los 30 y 60 días posteriores a la monta, se realizó una ecografía por medio de un aparato de ultrasonido de pantalla (SonoAce 600, Medison) para verificar la fertilización efectiva y el desarrollo del producto.

Se consideró una duración promedio de gestación de 150 ± 3 días. Al día 147-148 de gestación se suministró dexametasona (16 mg/ml Dexadreson, Intervet) como inductor del parto en las ovejas nulíparas y multíparas, el cual ocurre entre 36 y 48 horas después de la inyección. Los sacrificios se realizaron 15-30 min. después del parto, después de verificar que las madres se mostraran maternales hacia su cría, es decir con emisión de balidos de baja frecuencia y lamidos constantes al recién nacido (limpieza de la cría) con una latencia menor a 5 minutos (Collias, 1956; Herscher *et al.*, 1963; Poindron *et al.*, 1984).

C. Colecta de los cerebros, inmunohistoquímica y análisis de los cortes.

1. Sacrificios

Las ovejas de ambos grupos (al *Estro* y al *Parto*) se decapitaron. Inmediatamente se localizaron las arterias carótidas en la porción ventral media del cuello y se canularon. Posteriormente se perfundió la cabeza utilizando una bomba de perfusión (Mod. 7753-70, COLE-PARMER). En este proceso, primero se suministraron 2 litros de solución salina al 0.9% conteniendo nitrito de sodio al 1.0% como vasodilatador y anticoagulante. A continuación, se perfundió con 4 litros de paraformaldehído al 4% en una solución de buffer fosfatos (0.1 M pH 7.4) con glutaraldehído al 0.5% y ácido pícrico al 15% (a una temperatura de 4°C). En total, el proceso de perfusión se realizó en un tiempo aproximado de 15 min.

2. Preparación del tejido

Una vez realizada la perfusión, se procedió a remover el cerebro cuidando no dañar las estructuras de interés. Posteriormente el cerebro se sometió a una post-fijación con paraformaldehído al 4% (en solución buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.4) y ácido pícrico al 15% por espacio de 24 horas a 4°C. Después de esto, el cerebro fue seccionado en tres bloques: el primero a partir de los bulbos olfatorios hasta el inicio del quiasma óptico; el segundo bloque a partir del quiasma óptico hasta el inicio de los cuerpos mamilares (bloque de interés) y el tercero de los cuerpos mamilares hasta el puente y bulbo raquídeo. Estos bloques fueron sumergidos en una solución de sacarosa al 30% y azida de sodio al 1% para crioproteger el tejido, luego se mantuvieron a 4°C hasta el momento de realizar los cortes en el microtomo de congelación.

El primer y tercer bloque se almacenaron y solo se utilizó el segundo bloque correspondiente a las regiones hipotalámicas. A este bloque se le retiró la corteza cerebral con el fin de colocar las secciones en un portaobjetos de 2.4 X 7.6 cm, debido a que el tamaño del encéfalo excede las dimensiones de la laminilla y además, facilita la realización de los cortes en el microtomo de congelación (Mod. SM2000R, LEICA). La temperatura a la cual se realizaron los cortes fue de -25°C.

Se realizaron cortes coronales de 40 µm de grosor, los cuales se colectaron en platos de incubación con crioprotector (etilenglicol, sacarosa, buffer fosfatos pH 7.4, y H₂O destilada) para preservar el tejido hasta su procesamiento por inmunohistoquímica.

Se colectaron todas las secciones del bloque a partir de la banda diagonal de Broca hasta el inicio de los cuerpos mamilares. Estas secciones se seleccionaron con base en los atlas de cerebro de oveja de Richard (1967) y de Lehmann *et al.* (1993), y se utilizaron únicamente aquellas que contenían las estructuras de interés (APOM, NSO, NPV, AM y HMB) para ser procesadas por inmunohistoquímica.

Para obtener una representatividad de cada una de las estructuras, se tomaron 3 secciones que correspondían a la porción rostral, la porción media y la porción caudal del núcleo o área, cuidando que tuvieran el mismo nivel en cada uno de los cerebros colectados. Este criterio de selección ha sido utilizado anteriormente (Lehmann *et al.*, 1993; Blache *et al.*, 1994). Posterior a esto, los cortes se procesaron por IHQ, técnica que se describe a continuación.

3. Inmunohistoquímica

Es importante mencionar que en cada sesión de inmunohistoquímica, siempre se incubaron secciones de los diferentes grupos experimentales; es decir, tuvieron el mismo tiempo de incubación y el mismo tratamiento. Tanto en Francia como en México se obtuvieron varios cortes de las secciones representativas de cada estructura, los cuales se intercambiaron entre ambos laboratorios a fin de realizar el tratamiento inmunohistoquímico de manera separada en cada laboratorio sobre cortes adyacentes, para asegurarse de la homogeneidad de los resultados.

La inmunohistoquímica se realizó en secciones en "libre flotamiento". Dichas secciones se sometieron a una serie de lavados, comenzando por una solución conteniendo peróxido de hidrógeno al 1.0% durante 1 hora para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas. A continuación, se incubaron por espacio de 1 hora en una solución con PBS-Tritón-Azida y suero albúmina de bovino (BSA, SIGMA) al 2%. Después, se realizó la incubación en el anticuerpo primario 1D5 a una concentración 1/10 durante 60 horas a 4°C. Este anticuerpo es de tipo monoclonal anti-RE y actúa directamente contra el dominio N-terminal de los receptores alfa en humanos; fue generosamente donado por el Dr. G. Delsol en Francia y está disponible por la compañía DAKO, en Copenhage, Dinamarca, anticuerpo M7047. Luego, el tejido se sometió a una serie de lavados en PBS (3 durante 10 min.) y a continuación fue incubado en el anticuerpo secundario (sheep anti-mouse peroxidasa, Jackson-ImmunoResearch) a una concentración de 1/500 por 3 hrs. a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente lavados en PBS (3 de 10 min. c/u) y Tris HCl (0.05 M, pH 7.6; 2 lavados de 10 min. c/u). Para finalizar, se llevó a cabo la revelación con diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA) intensificada con sulfato de níquel-amonio (FISHER-LABS) al 0.2% en Tris HCl, adicionando 0.003% de peróxido de hidrógeno, lo cual nos dio un precipitado de color negro-azulado. Los controles de la reacción de inmunohistoquímica consistieron en la omisión del anticuerpo primario en el protocolo de tinción. Además, se realizó otro control de la reacción con una pre-adsorción del anticuerpo 1D5 (1:10 a 4°C) con 10 ng/ml de proteína sintética en PBS-Tritón-Azida y suero albúmina de bovino por 2 horas.

La especificidad de este anticuerpo han sido probada anteriormente en rata (Simonian y Herbison, 1997) y en oveja (Skinner y Herbison, 1997).

Una vez realizada la IHQ, el tejido se montó en porta-objetos con gelatina (al 0.5% y cromó-alúmina al 0.025%, FISHER-LABS) y se sometió a una serie graduada de alcoholes (70%, 80%, 96% y 100%, 1 min. en c/u) para deshidratarlo. El montaje permanente se realizó con cubre-objetos con permount (marca J.T. BAKER).

Para la localización e identificación de las estructuras hipotalámicas del cerebro de la oveja, se realizó una tinción con violeta de cresilo en secciones adyacentes a los cortes seleccionados para corroborar la localización exacta de las células inmunomarcadas.

4. Análisis del tejido

Las secciones se analizaron en un microscopio de luz (Optiphot-2, NIKON) con objetivos de 20X, 10X y 4X, al cual se encontraba acoplada una cámara de video (GP-MF200, PANASONIC) y ésta a una computadora (Pentium, ACER) con un sistema de análisis de imágenes (BiocomHisto 5000, Francia) que permitió contabilizar de manera sistemática el número de neuronas inmunomarcadas en el tejido. La selección óptima de las células y su conteo se realizó con base en los siguientes parámetros:

- * Nivel de gris o contraste de gris = 120 (rango de 0 para negro absoluto y 255 para blanco)
- * Factor de forma = ovoide 0.80 (en el rango entre dos ejes geométricos centrales, siendo el número 1 para circunferencia y el 0 para líneas).
- * Tamaño (mayor a 5 μm y menor a 25 μm de diámetro)

El color gris de fondo (background) y la iluminación óptima del microscopio se establecieron en el sistema tomando en cuenta los valores promedio de 15 secciones. Este proceso aumentó el contraste entre los niveles de gris del núcleo y del fondo. El nivel de gris del núcleo también se tomó de un promedio de 20 células, facilitando el conteo de los objetos marcados. Las células inmunomarcadas se definieron por segmentación de la imagen, es decir, se tomó en cuenta el nivel de gris (objetos con niveles mayores a 110 y menores a 130), así como aquellos que fueran mayores a 5 μm y menores a 25 μm de diámetro. Por otra parte, con el factor de forma se consideraron solo los objetos de forma oval. Los objetos fuera de estos parámetros se consideraron como artefactos y se descartaron. Este

sistema, además de trabajar en forma automática también tiene la opción de trabajar en modo manual, lo que permite eliminar o marcar células que no son consideradas automáticamente. Con esto, cada campo se revisó individualmente y los objetos sospechosos o de otra naturaleza (como vasos capilares o residuos del cromógeno, DAB) se eliminaron manualmente. Del mismo modo, las células que se encontraban muy agrupadas o en conglomerados se contaron manualmente.

Una de las características más relevantes de éste sistema de análisis de imágenes es que nos permite realizar el conteo de grandes áreas o regiones cerebrales sin cometer errores de doble registro celular o doble conteo. La mayoría de los sistemas de análisis de imágenes están diseñados para analizar estructuras pequeñas (como es el caso del cerebro de la rata). Sin embargo, para cerebros tan grandes como el de la oveja, este sistema resulta ser muy útil pues es capaz de procesar una mayor cantidad de información y de analizar superficies más grandes. Además, facilita el almacenamiento de las coordenadas de las células para posteriormente realizar automáticamente un esquema donde se aprecia la localización de las células IR en la sección. Es importante mencionar que se contaron todas las células IR que se encontraban en el núcleo o área dentro de la sección de tejido analizada. La delimitación de estos (as) se corroboró con los cortes tratados con violeta de cresilo.

D. Variables analizadas y análisis estadístico

1.- Número total de células inmunorreactivas al RE2: definido como el número de células IR-RE2 que se localizaron dentro de un núcleo o área, promediando las 3 secciones estudiadas por cada uno de los animales.

2.- Densidad celular: esta se estimó obteniendo la suma total de células IR por unidad de superficie, expresada en mm^2 .

Se realizaron pruebas de Lilliefors a los datos obtenidos en cada una de las estructuras para verificar si estos tenían una distribución normal. El número de células en el NSO no mostró una distribución normal, por lo que estos datos fueron transformados a su raíz cuadrada para analizarlos con estadística paramétrica.

La cantidad de células en cada una de las áreas estudiadas fue comparada entre grupos mediante un análisis de varianza a dos factores (condición fisiológica o **CF**; y número de partos previos, **NPP**). Cuando se encontró un efecto significativo de alguno de los factores o de su interacción, se realizó una prueba *post-hoc* de Tukey para comparar las medias.

Todos estos análisis se realizaron con ayuda del programa estadístico SYSTAT Versión 7.0. Los resultados son presentados en media \pm error estándar.

VII. RESULTADOS

A. Descripción general y análisis cualitativo.

1. Características de las células IR-RE2.

Las células inmunopositivas se caracterizaron por la presencia de un precipitado negro-azulado en el núcleo. También las células presentaron marcaje heterogéneo, lo cual dependió de la estructura donde se localizaban. Los diversos tipos de marcaje encontrados fueron los siguientes: inmunorreactividad únicamente en el núcleo (Fig. 5), núcleo inmunorreactivo sin tinción en el nucleolo (Fig. 6), marcaje nuclear y también con reacción en el citoplasma y procesos celulares (dendritas y axones, Fig. 7). El tamaño de los núcleos reactivos a los RE2 fue en promedio de 8-15 μm de diámetro, que es similar a lo encontrado por Lehmann *et al.* (1993, 6-16 μm). En el tejido utilizado como control de la reacción de inmunohistoquímica, no se observó inmunorreactividad ni nuclear ni citoplásmica (Fig. 8).

2. Distribución general de los receptores a estradiol.

Los resultados obtenidos por medio de la técnica de IHQ nos muestran la presencia de células conteniendo RE2 en diversas estructuras fuera de nuestro estudio tales como: la Banda Diagonal de Broca (BDB), el septum lateral (SL), núcleo base de la stría terminal, y en las regiones ventrolaterales del hipotálamo anterior cerca del tracto olfatorio lateral (TOL).

Por otra parte, se encontró un mayor número de células inmunopositivas a los receptores a estradiol en el Area Preóptica y en el Hipotálamo Medio Basal. También se encontraron en estructuras como la Amígdala en su porción medial y cortical. Se encontró además, marcaje en el Núcleo Supraóptico y en el Núcleo Paraventricular aunque en menor cantidad con respecto al APOM e HMB, cuyas cifras se detallaran posteriormente.

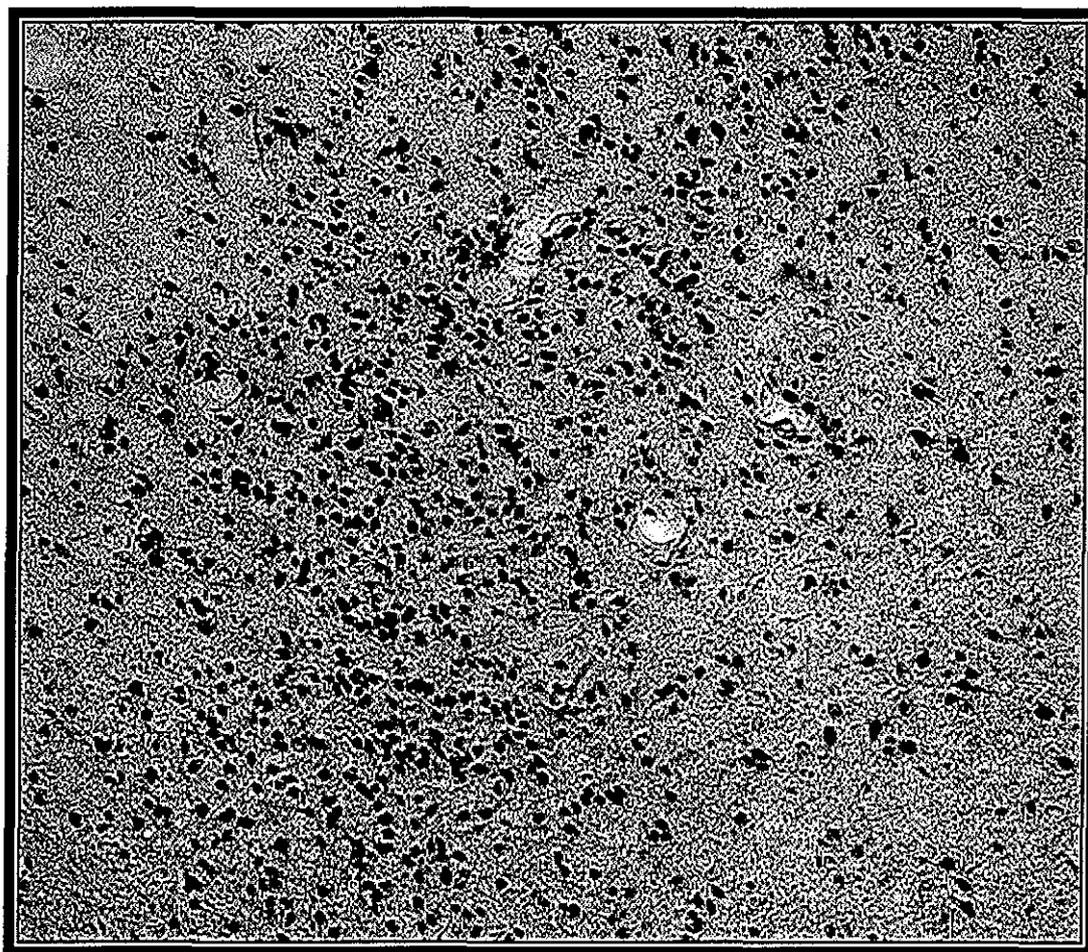


Figura 5. Microfotografía (10X) que ejemplifica el tipo de marcaje nuclear encontrado en la amígdala medial de una oveja múltipara al *estro*; el marcaje aparece como un precipitado negro-azulado en los núcleos celulares. Se encontró que el tipo de marcaje en esta región fue similar en todos los grupos estudiados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6a.

Marcaje encontrado en el núcleo supraóptico de una oveja nulípara de la condición fisiológica *estro* (40X). El marcaje fue similar en nulíparas y múltiparas de esta condición.

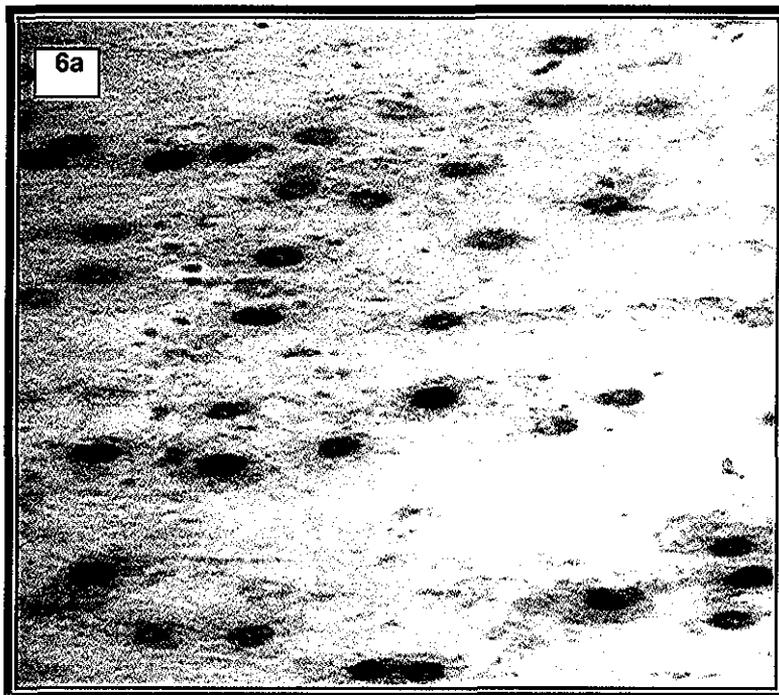
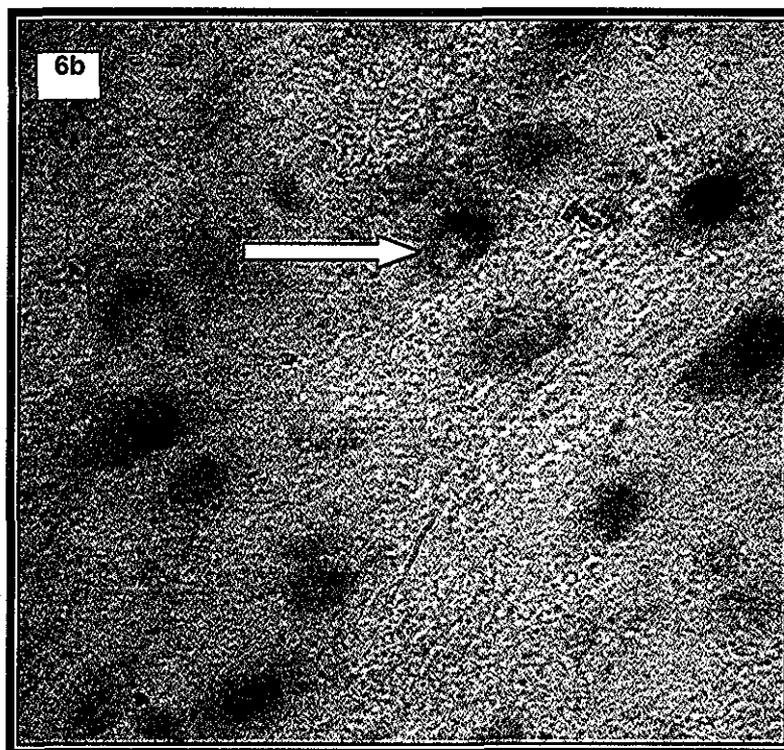


Figura 6b.

Esta figura muestra un acercamiento (100X) de la figura anterior donde indicamos la ausencia de tinción en el nucleolo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

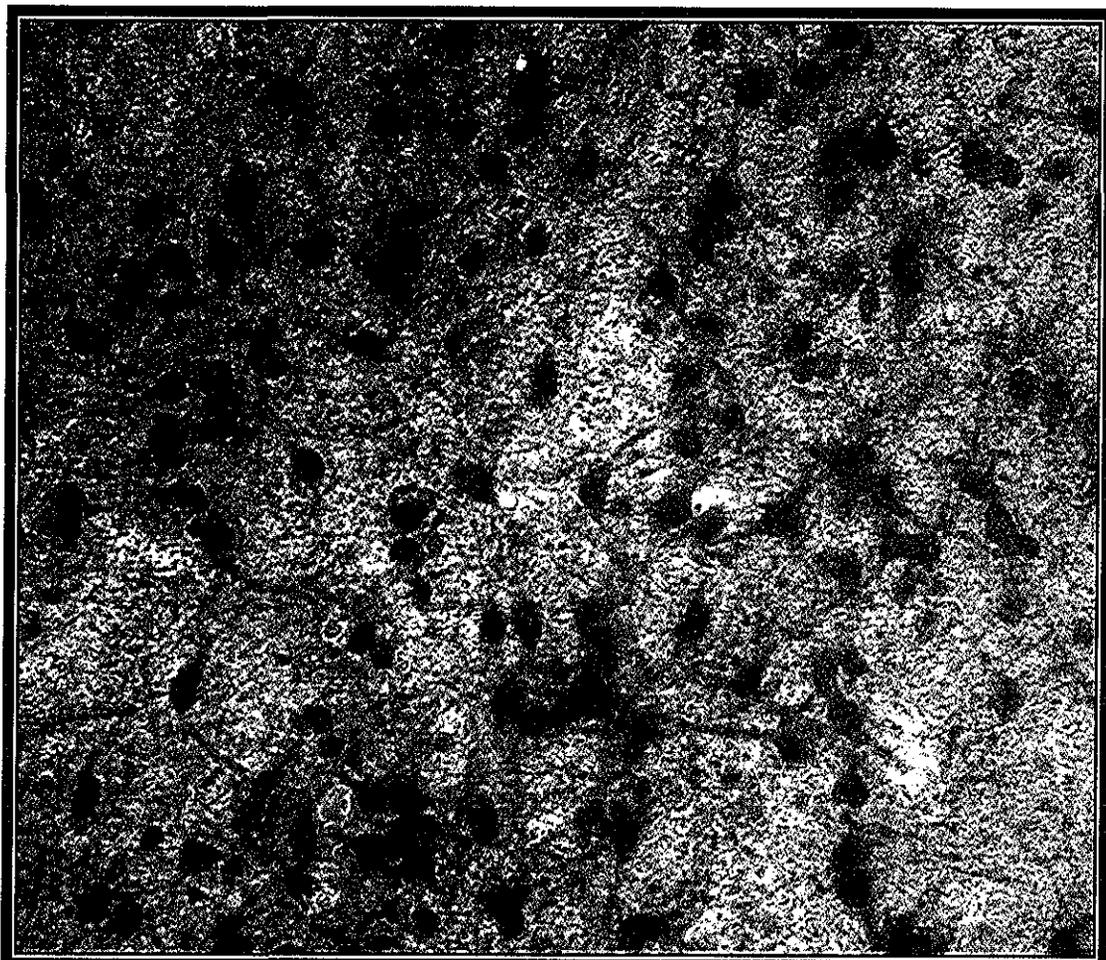
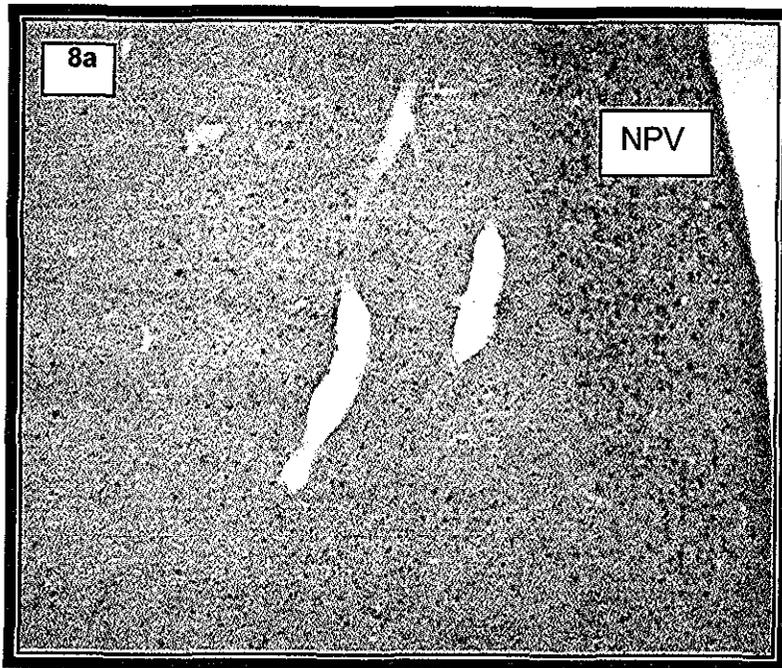
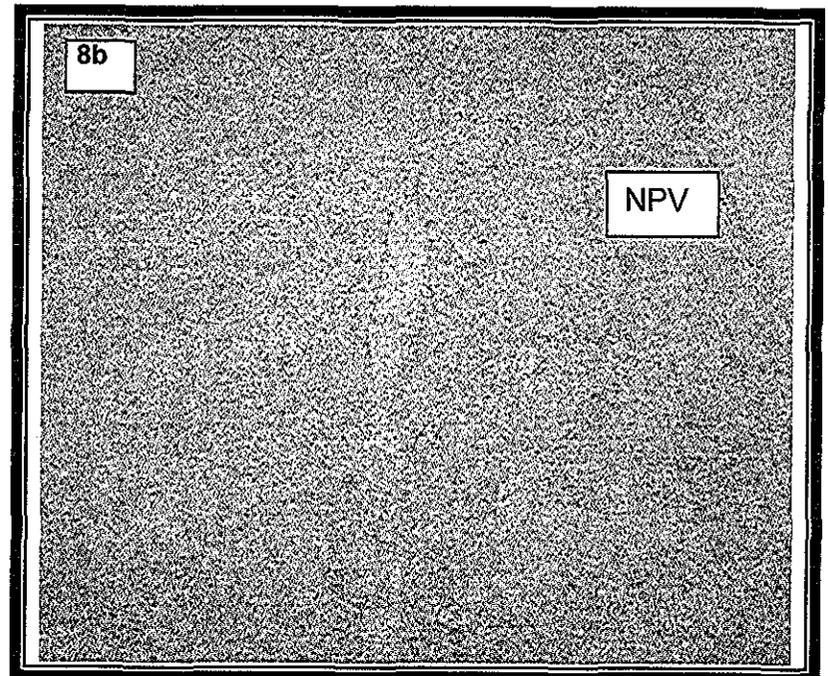


Figura 7. Microfotografía (40X) del área preóptica media de una oveja múltipara al *estro*. Se observó la inmunoreactividad en el pericarión y en los procesos celulares. El tipo de marcaje no varió en los demás grupos analizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Control de la reacción de inmunohistoquímica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En la figura superior (8a) se muestran células inmunomarcadas con el anticuerpo 1D5-DAKO en el NPV de una oveja al *estro*, mientras que en la inferior (figura 8b, corte adyacente al anterior y donde se omitió el anticuerpo primario) no se observa inmunorreactividad en el núcleo ni en el citoplasma.

3. Estudio de las estructuras de interés.

a) *Area Preóptica Media*. Se encontró un denso conglomerado de células inmunomarcadas a nivel del órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT). Las células en esta área presentaron un fuerte marcaje nuclear y citoplásmico. Las células marcadas se encontraron en toda la extensión del área preóptica desde su porción ventral en el OVLT hasta la comisura anterior y haciendo un continuum con las células del NBST. En el APOM, la mayor parte de las células presentaban marcaje nuclear y citoplásmico y muy pocas células presentaban marcaje nuclear únicamente (Fig. 9). Las células en esta área presentaban diámetros entre 8-12 μm . No se encontró marcaje en el área preóptica lateral. No se encontraron diferencias cualitativas en el marcaje entre los grupos.

b) *Núcleo Supraóptico*. El marcaje en este núcleo presentó características diferentes con respecto a la estructura anterior. En él, se encontraron células de un diámetro aun mayor (12-15 μm).

Además, este núcleo presentó una característica especial dependiendo del estado fisiológico de la hembra. En las ovejas al *Estro* (tanto en nulíparas como en múltiparas) el marcaje fue nuclear y el nucleolo no presentó inmunorreactividad. No se observaron células con marcaje citoplásmico (Fig. 10). Por el contrario, en los grupos al *Parto*, las células presentaron un marcaje diferente, pues se encontraron largos (80 μm) y abundantes procesos celulares en todo el NSO, con escasos cuerpos celulares inmunomarcados (Fig. 11). En relación con el NPP, no se observaron diferencias en el marcaje entre las hembras múltiparas y nulíparas de ambas condiciones.

c) *Núcleo Paraventricular*. Este núcleo presentó un denso marcaje inmunopositivo, y de igual forma que en el NSO, se observaron células con marcaje únicamente nuclear en los grupos al *Estro* (Fig. 12) y en los grupos al *Parto* se presentó un marcaje nuclear y citoplásmico (Fig. 13). Por otro lado, el número de partos previos no influyó en el tipo de marcaje encontrado en este núcleo.

d) *Amígdala Medial*. Las células con RE2 se localizaron en la porción medial y cortical de la amígdala. Se encontró una moderada tinción nuclear y una tinción citoplásmica muy tenue. La distribución celular fue homogénea en esta región (Fig. 14). Hubo pocas neuronas inmunorreactivas en su porción cortical. El tipo de marcaje encontrado en todos los grupos fue el mismo, es decir, no se encontraron diferencias en el marcaje en relación con la CF ni con el NPP.

e) *Hipotálamo Medio Basal*. El tipo de tinción encontrado fue de células con largos ($70\mu\text{m}$) procesos celulares marcados y cuerpos celulares de tamaño promedio ($10\text{-}13\mu\text{m}$) con fuerte marcaje. Las células de esta región tuvieron una distribución desde la parte intermedia del Fórnix y el NPV hasta el núcleo arcuato (NArc, Fig. 15). Los RE2 se localizaron en secciones un poco más rostrales en la porción media, cercana al tercer ventrículo; mientras que en secciones posteriores, el marcaje se presentó a manera de conglomerado celular, este fue el caso del hipotálamo ventromedial ventrolateral (HVM-VL, Fig. 16). El NArc, mostró marcaje nuclear en mayor cantidad que el citoplásmico (Fig. 17). El tamaño celular promedio fue de $8\text{-}12\mu\text{m}$ de diámetro. Para el HMB, tampoco se encontraron diferencias en el tipo de marcaje con respecto a la condición fisiológica ni con el número de partos previos.

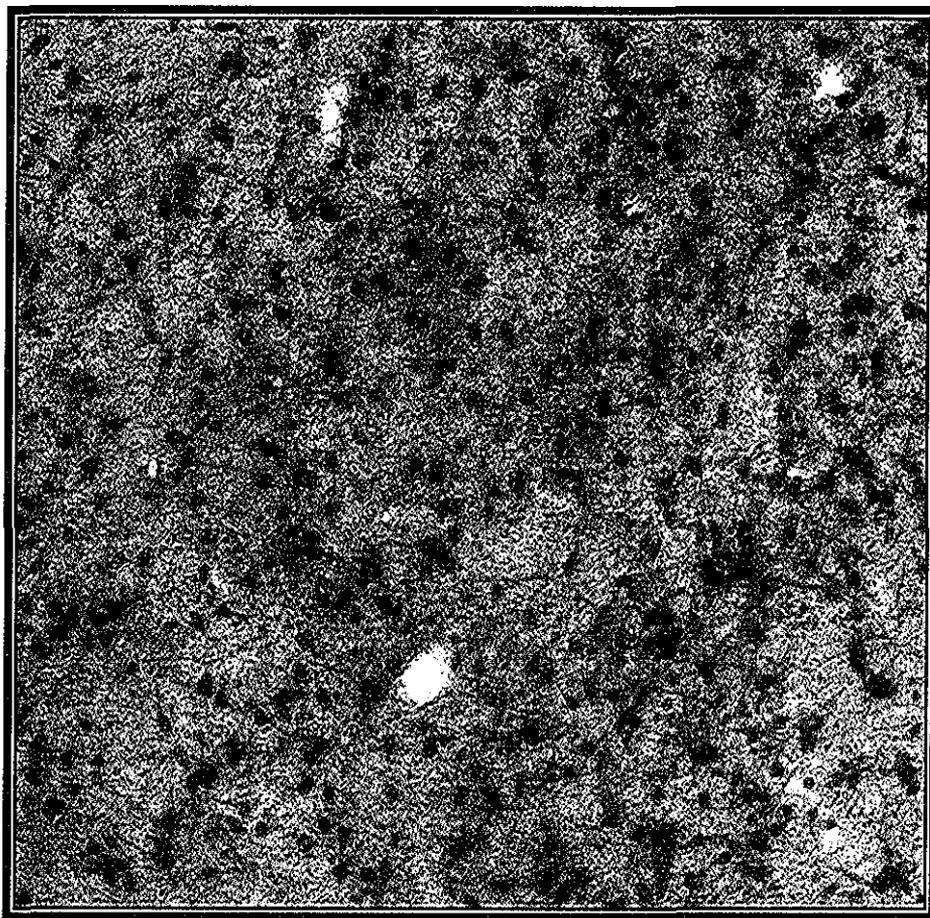


Figura 9. Ejemplo del tipo de marcaje encontrado en el área preóptica medial. Se aprecia una mayor cantidad de células con marcaje nuclear y citoplásmico que células únicamente con marcaje nuclear. La microfotografía (20X) pertenece a una hembra múltipara al *estro*, se encontró que el tipo de marcaje en esta región fue similar en todos los grupos estudiados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10.

Marcaje encontrado en el núcleo supraóptico de una oveja múltipara de la condición fisiológica *estro* (10X). El marcaje fue similar en nulíparas y múltiparas de esta condición.

La inmunorreactividad se presentó en los núcleos celulares, los cuales no mostraron tinción en el nucleolo. No se observaron células con marcaje citoplásmico.



Figura 11.

Ejemplo del marcaje encontrado en el núcleo supraóptico de una oveja múltipara al parto (10X). El marcaje fue similar en nulíparas y múltiparas de esta condición.

Contrario a la condición fisiológica *estro*, se observaron abundantes procesos celulares en todo el NSO, con escasos pericariones IR-RE2.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

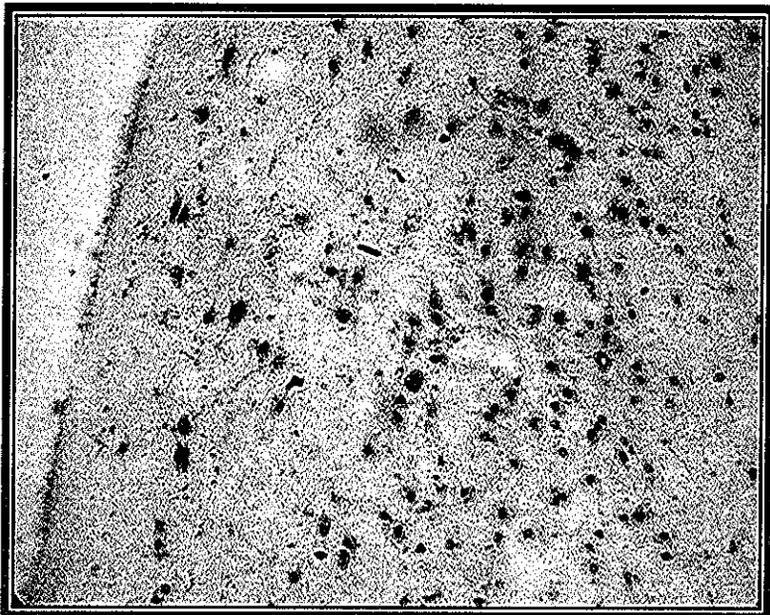


Figura 12.

Marcaje encontrado en el núcleo supraóptico de una oveja nulípara de la condición fisiológica *estro* (20X).

Se observaron células únicamente con tinción nuclear (20X). El marcaje fue similar en nulíparas y múltiparas de esta condición.

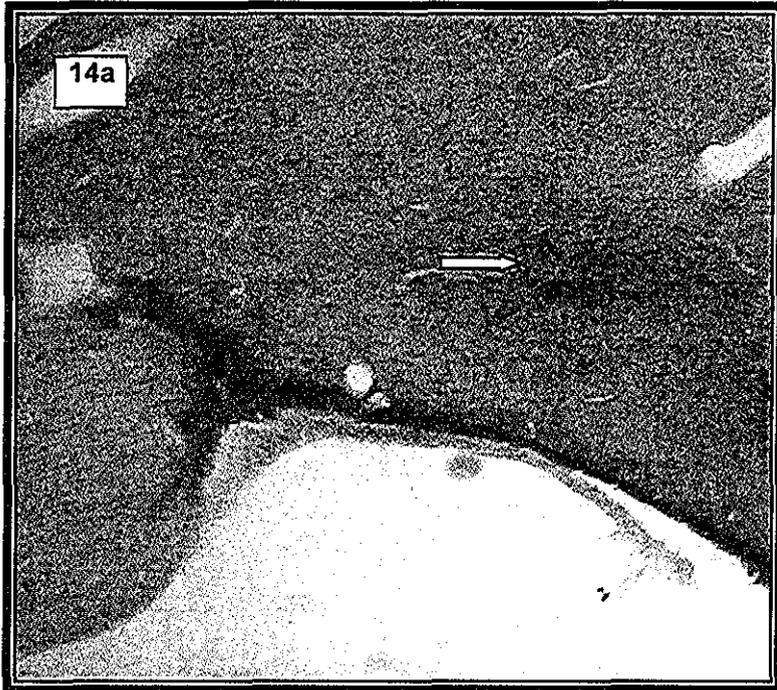


Figura 13.

Ejemplo del marcaje encontrado en el núcleo supraóptico de una oveja nulípara de la condición fisiológica *parto* (20X). El marcaje fue el mismo en hembras nulíparas y múltiparas de esta condición.

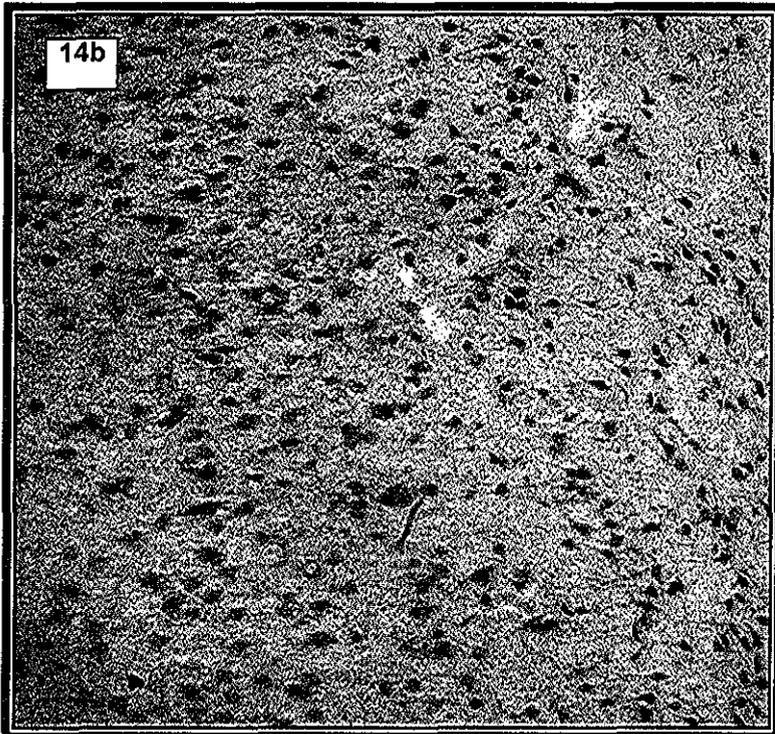
Abundantes células con marcaje nuclear y citoplásmico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figuras 14a y 14b. Tipo de marcaje en la amígdala medial de una oveja nulípara al *estro* (se observó el mismo marcaje en todos los grupos estudiados).

Se encontró una moderada tinción nuclear y una tinción citoplásmica muy tenue (4X y 20X, respectivamente).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 15. La microfotografía (2X) muestra un ejemplo de la distribución de las células IR-RE2 en el hipotálamo medio basal. La fotografía corresponde a una hembra múltipara al *estro*. Se encontró un marcaje similar en los demás grupos analizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 16. Ejemplo del marcaje en el hipotálamo ventromedial-ventrolateral de las ovejas múltiparas y nulíparas al *estro*. Se observaron abundantes procesos celulares inmunomarcados (20X).

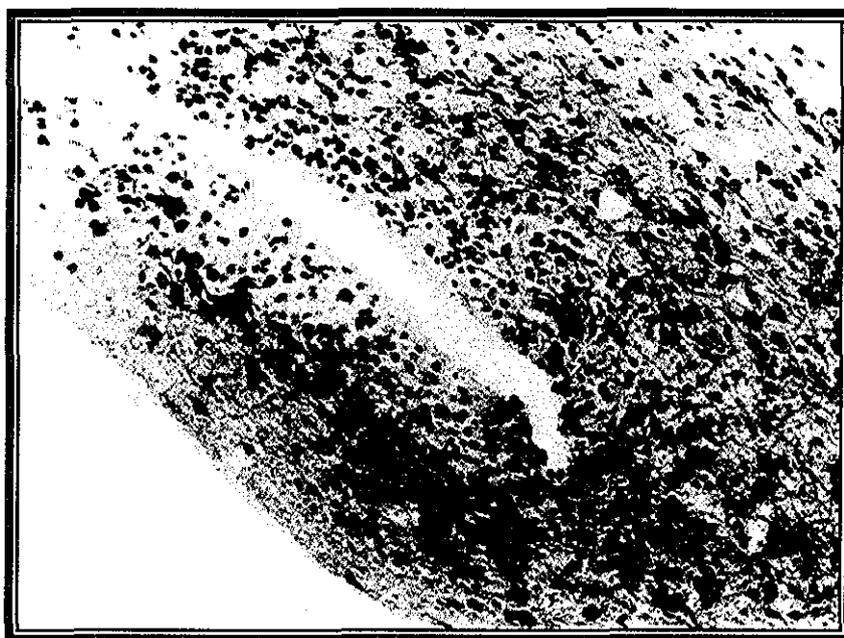


Figura 17. Inmunorreactividad en el núcleo arcuato. Mayor número de neuronas con IR nuclear que citoplásmica. Se observó el mismo marcaje en ovejas múltiparas y nulíparas de la condición fisiológica al *estro*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. ANALISIS CUANTITATIVO

1) Area preóptica media

a) Número total de células inmunopositivas

Para analizar posibles diferencias entre los grupos, se llevó a cabo un análisis de varianza, en donde se encontró un efecto significativo de la condición fisiológica (4427 ± 303 células IR-RE2 para el grupo *Estro* y 1803 ± 340 células IR-RE2 para el grupo al *Parto*, ANOVA, $F = 30.15$, gl: 1,30; $p < 0.001$), no así con respecto al NPP (2752 ± 420 células en ovejas *Múltiparas* vs. 3195 ± 504 cél. en ovejas *Nulíparas*, ANOVA, $F = 0.86$, gl: 1,30; $p = 0.36$). La interacción entre estos dos factores no fue significativa ($p = 0.75$, ANOVA, $F = 0.1$, gl: 1,30).

Al obtener un efecto significativo de la CF, se realizaron pruebas *post-hoc* (Tukey), y se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones fisiológicas tanto en las hembras múltiparas ($p < 0.001$) como en las nulíparas ($p = 0.01$, Figura 18).

En las Figuras 20 a, b, c y d, se muestran ejemplos de células inmunopositivas a RE2 de los 4 grupos experimentales. En estas figuras se ve claramente como en los animales de la CF *Estro*, el número de células es mayor al que se observa en el grupo al *Parto*. Por otro lado, en relación con el número de partos, queda claro que no existen diferencias significativas, al contrario de lo observado en la CF.

b) Densidad de células IR-RE2 por mm^2

En relación con la densidad celular, se encontró que la CF tuvo un efecto significativo (386 ± 28 cél. IR-RE2/ mm^2 al *estro* y 179 ± 26 cél. IR-RE2/ mm^2 al *parto*, ANOVA, $F = 27.01$, gl: 1,30; $p < 0.001$), mientras que el efecto de la paridad no fue significativo (268 ± 31 múltiparas vs. 273 ± 44 nulíparas, $F = 0.06$, gl: 1,30; $p = 0.81$), ni tampoco la interacción ($p = 0.61$, $F = 0.28$, gl: 1,30). Eso corrobora los resultados obtenidos para número total de células inmunomarcadas en el APOM, mientras que la prueba *post-hoc* (Tukey) también muestra diferencias significativas tanto en *Múltiparas* como en *Nulíparas* ($p = 0.01$ y $p = 0.02$ respectivamente. Figura 19).

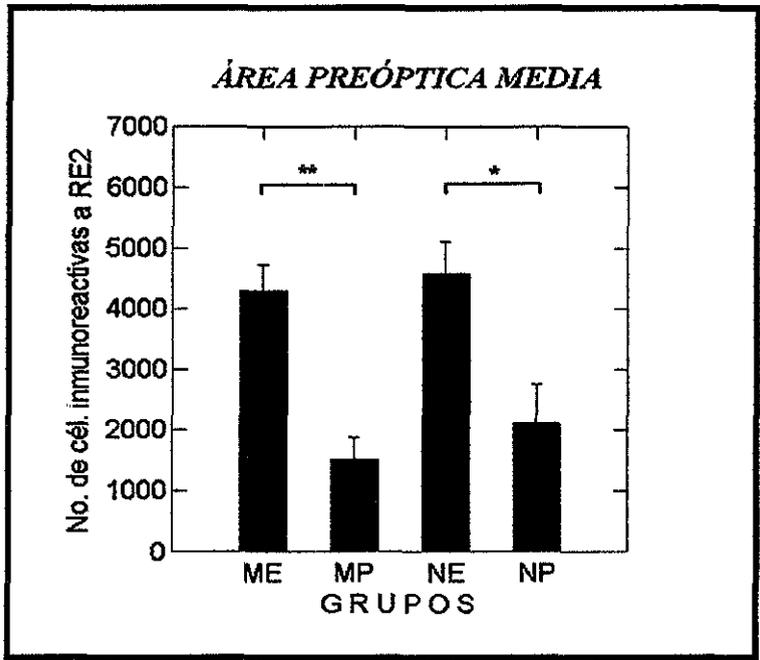


Figura 18. Número total de células inmunorreactivas a RE2 en APOM, las barras representan la media \pm el error estándar (Media \pm ES). ME=Multípara Estro, MP=Multípara Parto, NE=Nulípara Estro, NP=Nulípara Parto. * $p=0.01$ y ** $p<0.001$ (ANOVA seguida de Tukey)

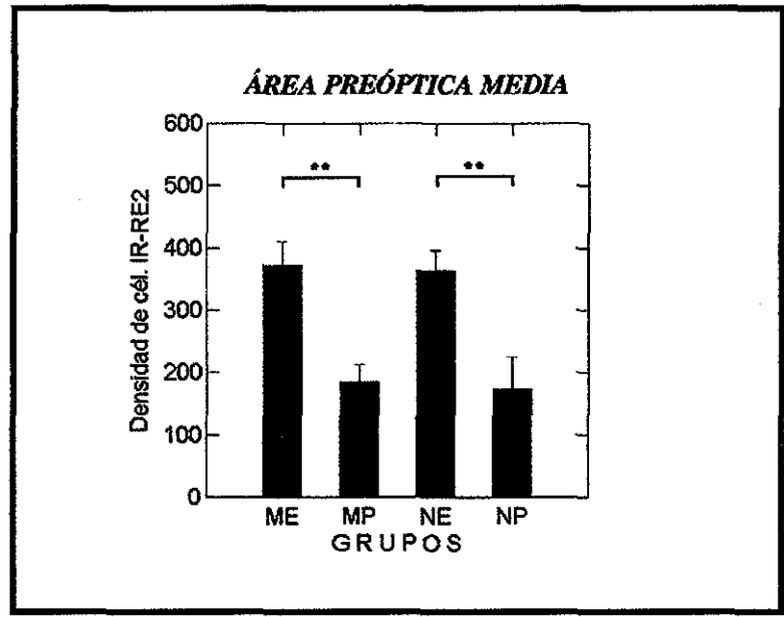
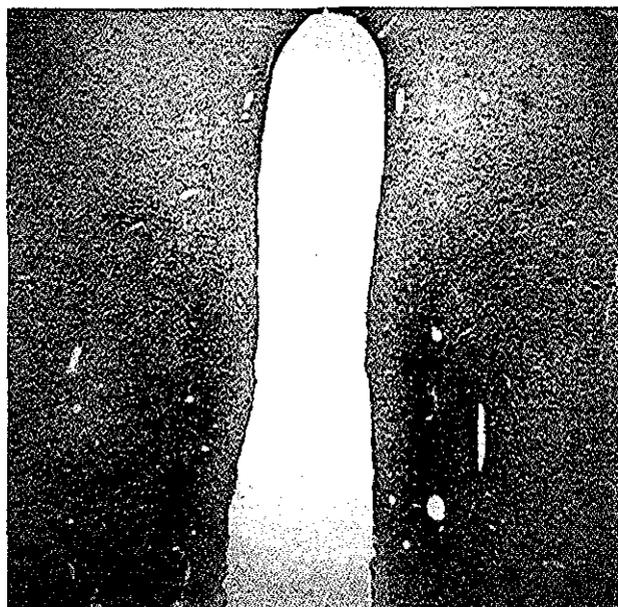
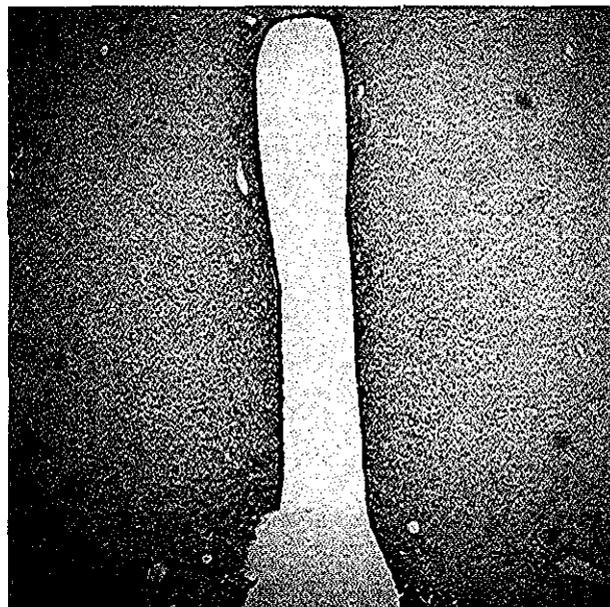


Figura 19. Densidad de células por mm² en el APOM. ** $p<0.05$ (ANOVA seguida de Tukey)

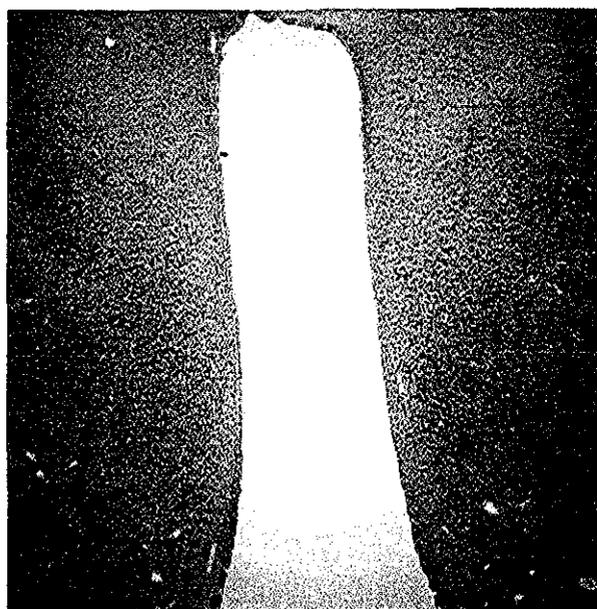
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



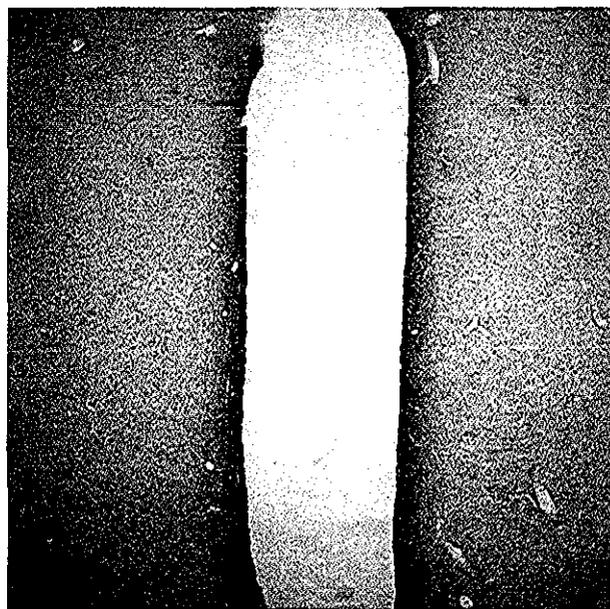
a) Multipara Estro



b) Multipara Parto



c) Nullípara Estro



d) Nullípara Parto

Figura 20 (a, b, c, d). Ejemplos de la distribución de las células IR-RE2 en el área preóptica medial en los 4 grupos experimentales (4X).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2) Núcleo supraóptico

a) Número total de células inmunopositivas

En la prueba de ANOVA, la CF presentó un efecto significativo (*Estro*: 2041 ± 216 vs *Parto*: 393 ± 73 , ANOVA, $F = 88.98$, gl: 1,30; $p < 0.001$). Por otro lado, el NPP al igual que para la estructura anterior, no afectó de manera significativa el número de células marcadas (*multíparas*: 1226 ± 256 vs *nulíparas*: 1002 ± 237 , $F = 1.32$; gl: 1,30; $p = 0.26$) y tampoco se encontró una interacción entre estos dos factores ($p = 0.72$, $F = 0.13$, gl : 1,30, Figura 21).

En las pruebas *post-hoc*, se encontraron diferencias significativas en los grupos de *Multíparas* y de *Nulíparas* con respecto a la CF, ($p < 0.001$, ver figura 21).

b) Densidad de células IR-RE2 por mm^2

La prueba de ANOVA para densidad, reveló las mismas diferencias que para el número total de células. La CF tuvo un efecto significativo (*Estro*: 16 ± 1 vs. *Parto*: 8 ± 1 , $F = 63.70$, gl: 1,30, $p < 0.001$, pero no así el NPP (*Multíparas*: 12 ± 1 vs. *Nulíparas* 11 ± 1 , $F = 1.99$, gl : 1,30, $p = 0.17$) y tampoco la interacción entre los dos factores ($p = 0.30$, $F = 1.13$, gl: 1,30). La prueba *post-hoc*, muestra diferencias entre las dos CF, tanto en *Multíparas* ($p < 0.001$) como en *Nulíparas* ($p < 0.001$. Ver figura 22).

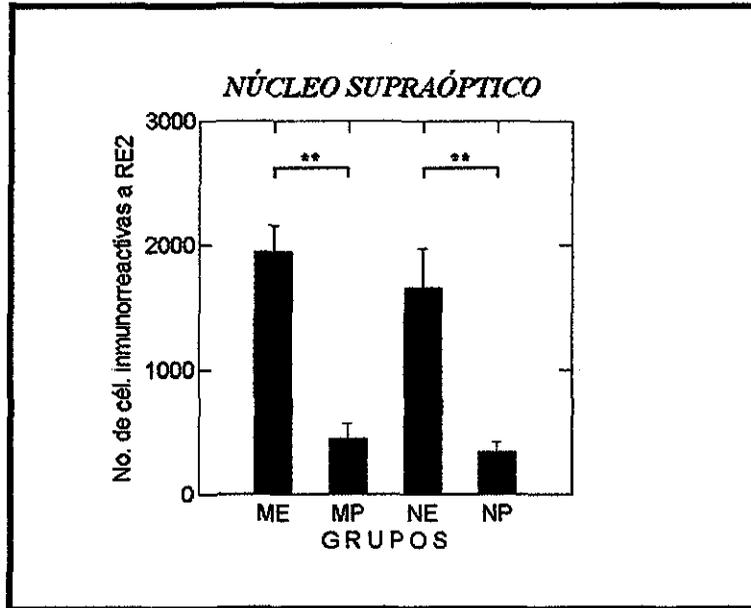


Figura 21. Número de células inmunorreactivas a RE2 en NSO, (Media \pm ES). ME=Múltipara Estro, MP=Múltipara Parto, NE=Nulípara Estro, NP=Nulípara Parto.

****p<0.001 ANOVA seguida de Tukey)**

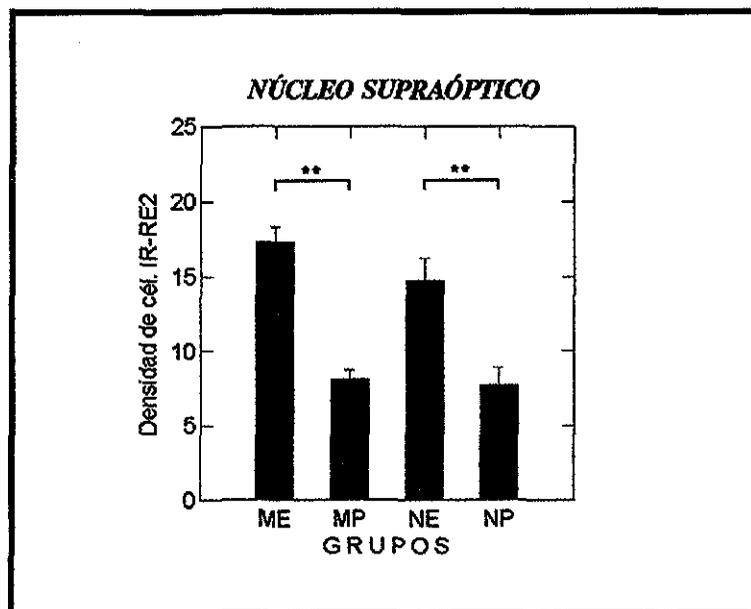


Figura 22. Densidad de células IR-RE2 en el núcleo supraóptico **** p<0.001**

(ANOVA seguida de Tukey)

3) Núcleo paraventricular

a) Número total de células inmunopositivas

El análisis de ANOVA indica que la CF presenta el mismo efecto que en las estructuras anteriores (*Estro* 1484 ± 150 y *Parto* 659 ± 93 , $F = 21.90$, gl: 1,29, $p < 0.001$, Figura 23). El NPP en éste núcleo tampoco presenta un efecto significativo (1068 ± 176 en ovejas *múltiparas* y 997 ± 136 en *nulíparas*, $F = 0.08$, gl: 1,29, $p = 0.77$), ni la interacción condición fisiológica-número de partos ($p = 0.59$, $F = 6.30$, gl: 1,29). El análisis *post-hoc* indicó que el efecto de la CF fue significativo tanto en hembras *múltiparas* como en *nulíparas* ($p = 0.005$ en ambos grupos, Tukey).

b) Densidad de células IR-RE2 por mm^2

De nueva cuenta, la CF tuvo un efecto significativo (*Estro*: 114 ± 10 vs. *Parto*: 55 ± 5 , $F = 20.77$, gl: 1,27; $p < 0.001$), pero no el NPP (*Múltiparas*: 86 ± 13 vs. *Nulíparas* 82 ± 10 , $F = 0.04$, gl: 1,27; $p = 0.85$), tampoco se encontró una interacción significativa ($p = 0.64$, $F = 0.22$; gl: 1,27) en el análisis de varianza.

Análisis Post-hoc. Se presentaron diferencias significativas en las hembras *múltiparas* ($p = 0.006$) y en hembras *nulíparas* ($p = 0.04$, Figura 24)

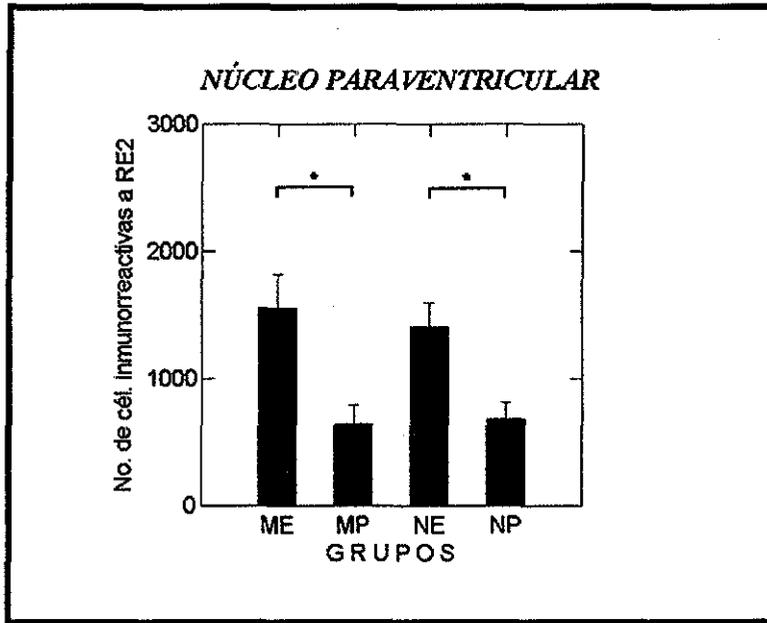


Figura 23. Número de células inmunorreactivas a RE2 en NPV, (Media±ES). ME=Múltipara Estro, MP=Múltipara Parto, NE=Nulípara Estro, NP=Nulípara Parto. * p=0.005 (ANOVA seguida de Tukey)

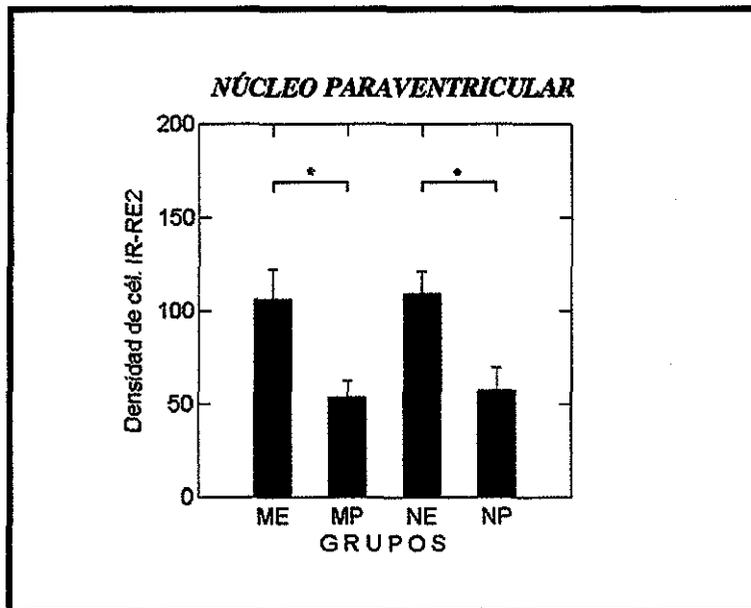


Figura 24. Densidad de cél. IR-RE2 en el Núcleo Paraventricular *p<0.05 (ANOVA seguida de Tukey)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

4) Amígdala Medial

a) Número total de células inmunopositivas

En esta estructura el número de células IR-RE2 no difirió significativamente en relación con la CF (1780 ± 238 para el grupo al *Estro* y 1323 ± 159 para el grupo al *Parto*, ANOVA, $F = 2.48$; gl: 1,25; $p = 0.18$), ni en el NPP (1506 ± 231 en *multíparas* y 1583 ± 180 en *mulíparas*, $F = 0.3$, gl: 1,25; $p = 0.87$). Tampoco se encontró una interacción entre estos dos factores ($p = 0.12$, $F = 2.62$, gl: 1,25. Figura 25).

b) Densidad de células IR-RE2 por mm^2

Los resultados obtenidos varían un poco con respecto a los del número total de células: para la CF se encontró un efecto significativo (*Estro*: 295 ± 24 vs. *Parto* 207 ± 20 , ANOVA, $F = 7.86$, gl: 1,24; $p = 0.02$), mientras que no fue el caso para el número de partos (*multíparas*: 221 ± 36 vs *mulíparas*: 274 ± 16 , $F = 2.11$, gl: 1,24; $p = 0.16$) ni para su interacción con la condición fisiológica ($p = 0.25$, $F = 1.39$, gl: 1,24). El análisis *post-hoc* reveló una diferencia significativa en el grupo de las ovejas *multíparas* (*Estro* : 294 ± 24 vs. *Parto* : 207 ± 20 , $p = 0.01$. Ver figura 26).

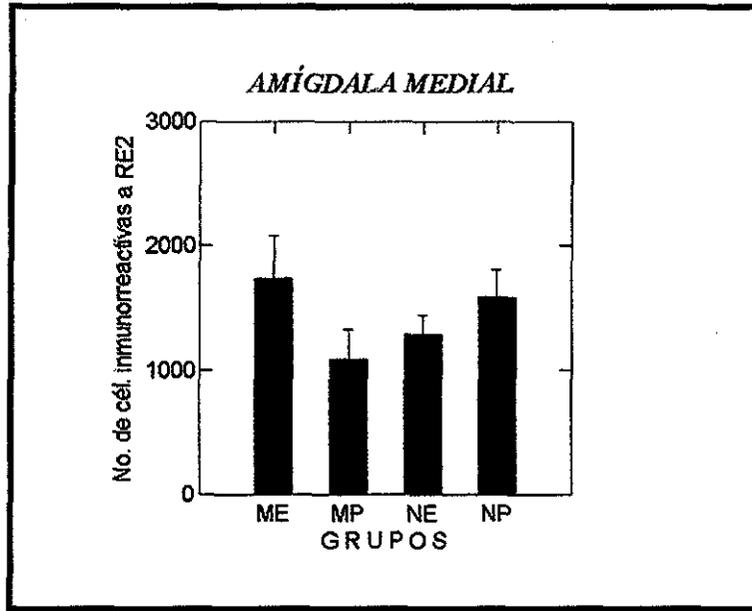
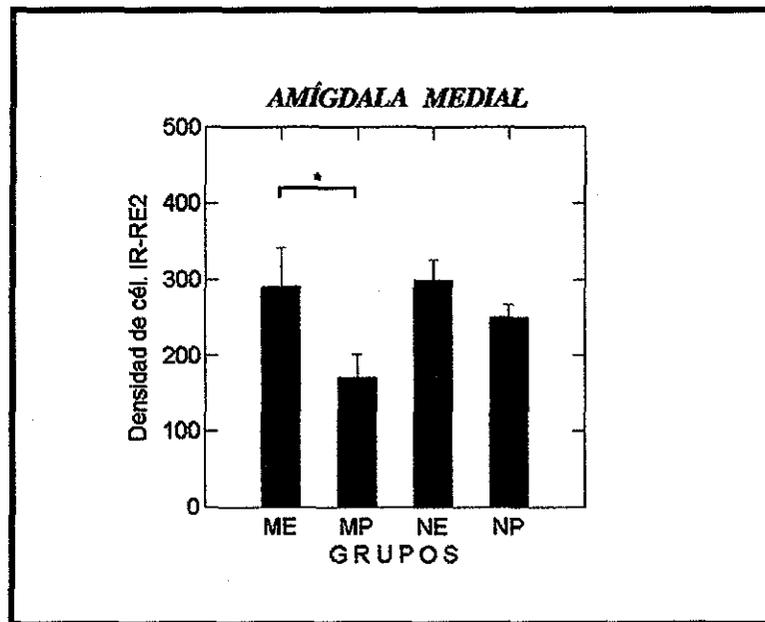


Figura 25. Número de células inmunorreactivas a RE2 en AM, (Media \pm ES). ME=Multípara Estro, MP=Multípara Parto, NE=Nulípara Estro, NP=Nulípara Parto. (No Significativa, ANOVA)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 26. Densidad de cél. IR-RE2 en la Amígdala Medial * $p < 0.05$ (ANOVA seguida de Tukey)

d

5) Hipotálamo medio basal

a) Número total de células inmunopositivas

De manera similar a lo que ocurre en las demás estructuras, existe en el HMB un efecto significativo de la condición fisiológica (2845 ± 177 cél. IR-RE2 para el grupo al *Estro* y 1848 ± 171 cél. para el grupo al *Parto*. ANOVA, $F = 17.63$, gl: 1,29; $p < 0.001$), y no un efecto del NPP como tal (2348 ± 247 células IR-RE2 vs. 2252 ± 171 cél. IR-RE2 para los grupos de *multíparas* y *nulíparas* respectivamente, ANOVA, $F = 0.26$, gl: 1,29; $p = 0.62$). Sin embargo, se encontró una interacción significativa entre la CF y el NPP ($p = 0.02$, $F = 6.34$, gl : 1,29).

En la prueba *post-hoc*, encontramos además una diferencia significativa de la CF en *multíparas* ($p < 0.001$) pero no en *nulíparas* (Figura 27).

b) Densidad de células IR-RE2 por mm^2

La CF tuvo un efecto significativo (*Estro*: 219 ± 151 vs. *Parto* : 151 ± 12 , ANOVA, $F = 18.93$, gl: 1,29; $p < 0.001$) al igual que para el número de células, mientras que eso no fue el caso para el NPP (*multíparas*: 180 ± 14 vs *nulíparas*: 185 ± 13 , $F = 0.12$, gl: 1,29; $p = 0.74$) y tampoco existió una interacción significativa ($p = 0.25$, $F = 1.4$; gl: 1,29. Ver figura 28), caso contrario a lo encontrado en el número total de células.

Para esta variable, el análisis *post-hoc* reveló una diferencia significativa solamente entre hembras *Multíparas* ($p = 0.002$, Tukey).

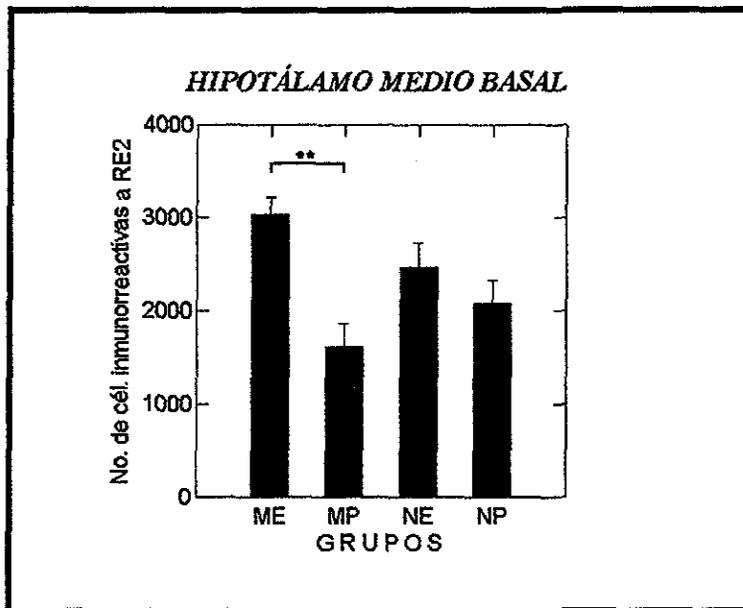


Figura 27. Número de células inmunorreactivas a RE2 en HMB, (Media±ES). ME=Multípara Estro, MP=Multípara Parto, NE=Nulípara Estro, NP=Nulípara Parto.

**p<0.001 (ANOVA seguida de Tukey)

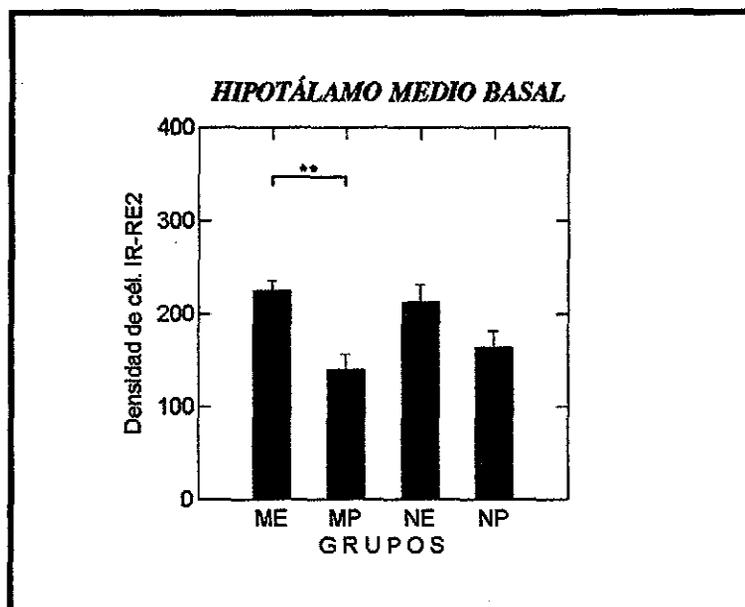


Figura 28. Densidad de cél. IR-RE2 en el HMB

**p=0.02 (ANOVA seguida de Tukey)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6) Influencia del origen de los animales.

Además de los resultados obtenidos para cada una de las estructuras en los diferentes grupos de animales, se llevó a cabo una comparación por separado de los resultados de las ovejas mexicanas y francesas, para verificar si nuestros resultados eran consistentes, independientemente del origen de las hembras

Los efectos encontrados fueron los mismos en cuanto a **CF** y **NPP**. Con respecto a la condición fisiológica, se encontró un menor número de células al *Parto* que en la condición al *Estro*, tanto en ovejas de origen francés como en las de origen mexicano, mientras que no se encontró un efecto claro de la variable NPP (Tabla 1)

Por otra parte, como se puede notar en la tabla 1, hubo un mayor número de células en varias estructuras de las hembras francesas al momento del parto que en hembras de origen mexicano. Esto también se observa en relación a la densidad de células IR-RE2 (Tabla 2)

En el APOM se encontró que el número de células IR al *Parto* fue mayor en las ovejas francesas que en las mexicanas en ambos grupos (múltiparas y nulíparas), presentándose una diferencia significativa (2800 ± 434 cél IR en ovejas *francesas* y 696 ± 155 cél. IR en ovejas *mexicanas*. $p = 0.001$. Figura 29). Para realizar este último análisis, se utilizó la prueba T de Student.

En la amígdala medial se encontró un resultado similar (1615 ± 162 en *francesas* y 737 ± 141 en *mexicanas*, T de Student; $p = 0.001$ Figura 30). Eso también fue el caso para el hipotálamo medio basal en la CF de *Parto* (2291 ± 150 cél IR en ovejas *francesas* y 1295 ± 211 cél. IR en ovejas *mexicanas*. T de Student; $p = 0.001$. Figura 31).

En cambio, en estas mismas estructuras, no se encontraron diferencias significativas en la condición *estro*, y en ninguna de las dos condiciones fisiológicas para las demás estructuras.

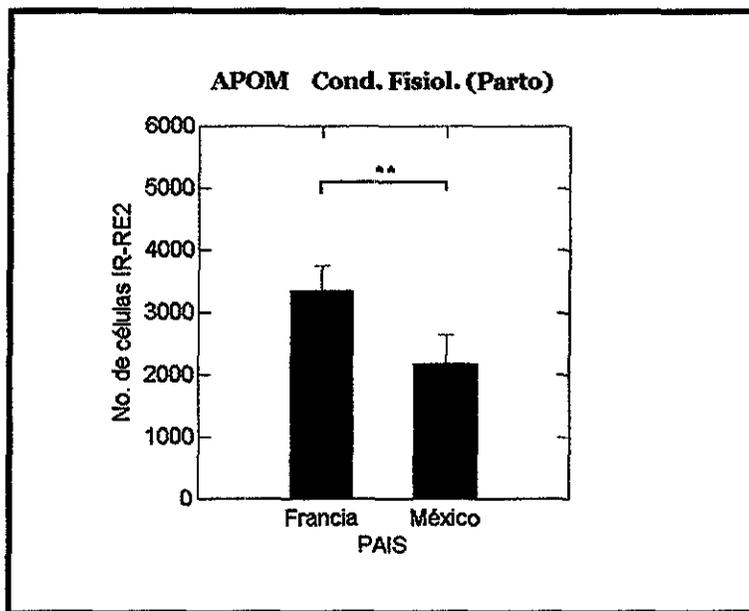


Figura 29. Número de células IR-RE2 en el APOM (Media±EE), en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto. ** $p=0.001$ (Prueba T de Student)

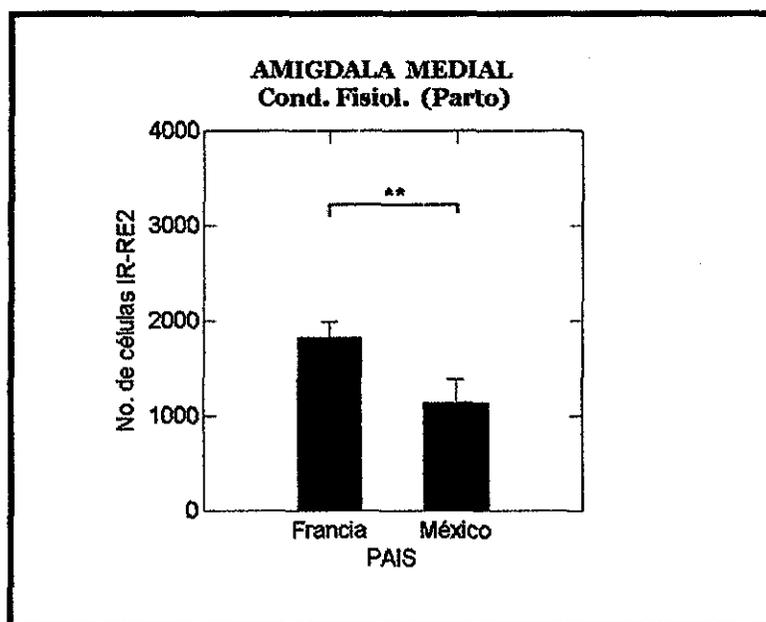


Figura 30. Número de células IR-RE2 en la Amígdala medial (Media±ES), en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto. ** $p=0.01$ (Prueba de T-Student)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

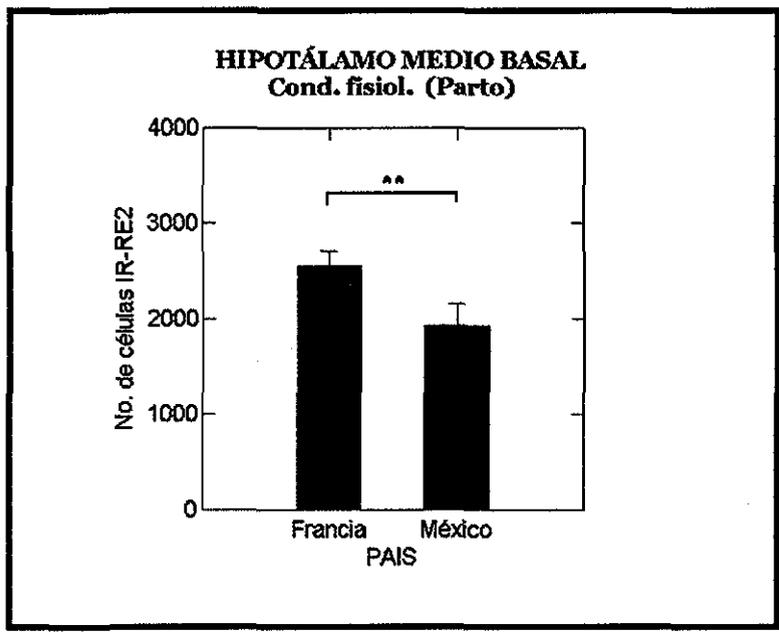


Figura 31. Número de células IR-RE2 en el HMB (Media±ES), en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto. **p=0.001 (Prueba de T-Student)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTRUCTURA		FRANCIA	MEXICO
APOM	CF	<i>Estro</i> : 4526 ± 546 vs <i>Parto</i> : 2800 ± 434 F = 6.09 ; gl = 1,13 ; p = 0.03	<i>Estro</i> : 4339 ± 343 vs <i>Parto</i> : 695 ± 155 F = 97.20 ; gl = 1,13 ; p < 0.001
	NPP	<i>Múltip</i> : 3231 ± 584 vs <i>Nulip</i> : 3826 ± 529 F = 0.76 ; gl = 1,13 ; p = 0.4	<i>Múltip</i> : 2273 ± 592 vs <i>Nulip</i> : 2564 ± 834 F = 0.09 ; gl = 1,13 ; p = 0.77
	INTERACCION	p = 0.43 ; gl = 1,13 ; F = 0.66	p = 0.27 ; gl = 1,13 ; F = 1.31
NSO	CF	<i>Estro</i> : 2257 ± 392 vs <i>Parto</i> : 468 ± 127 F = 21.80 ; gl = 1,13 ; p < 0.001	<i>Estro</i> : 1855 ± 222 vs <i>Parto</i> : 311 ± 60 F = 44.68 ; gl = 1,13 ; p < 0.001
	NPP	<i>Múltip</i> : 1395 ± 437 vs <i>Nulip</i> : 992 ± 345 F = 0.71 ; gl = 1,13 ; p = 0.41	<i>Múltip</i> : 1059 ± 294 vs <i>Nulip</i> : 1013 ± 351 F = 0.33 ; gl = 1,13 ; p = 0.57
	INTERACCION	p = 0.60 ; gl = 1,13 ; F = 0.28	p = 0.91 ; gl = 1,13 ; F = 1.13
NPV	CF	<i>Estro</i> : 1693 ± 252 vs <i>Parto</i> : 682 ± 132 F = 12.83 ; gl = 1,13 ; p = 0.03	<i>Estro</i> : 1302 ± 164 vs <i>Parto</i> : 629 ± 134 F = 8.76 ; gl = 1,12 ; p = 0.012
	NPP	<i>Múltip</i> : 1103 ± 291 vs <i>Nulip</i> : 1094 ± 205 F = 0.2 ; gl = 1,13 ; p = 0.88	<i>Múltip</i> : 1030 ± 204 vs <i>Nulip</i> : 901 ± 188 F = 0.32 ; gl = 1,12 ; p = 0.58
	INTERACCION	p = 0.71 ; gl = 1,13 ; F = 0.14	p = 0.86 ; gl = 1,12 ; F = 0.3
AM	CF	<i>Estro</i> : 1232 ± 282 vs <i>Parto</i> : 1615 ± 162 F = 2.9 ; gl = 1,13 ; p = 0.11	<i>Estro</i> : 1428 ± 352 vs <i>Parto</i> : 737 ± 141 F = 2.53 ; gl = 1,8 ; p = 0.15
	NPP	<i>Múltip</i> : 1653 ± 235 vs <i>Nulip</i> : 1990 ± 207 F = 1.0 ; gl = 1,13 ; p = 0.33	<i>Múltip</i> : 1241 ± 465 vs <i>Nulip</i> : 1039 ± 115 F = 0.28 ; gl = 1,8 ; p = 0.61
	INTERACCION	p = 0.55 ; gl = 1,13 ; F = 0.37	p = 0.3 ; gl = 1,8 ; F = 1.26
HMB	CF	<i>Estro</i> : 3163 ± 244 vs <i>Parto</i> : 2291 ± 150 F = 10.03 ; gl = 1,13 ; p = 0.007	<i>Estro</i> : 2567 ± 223 vs <i>Parto</i> : 1295 ± 211 F = 230.71 ; gl = 1,12 ; p < 0.001
	NPP	<i>Múltip</i> : 2635 ± 293 vs <i>Nulip</i> : 2666 ± 163 F = 0.02 ; gl = 1,13 ; p = 0.97	<i>Múltip</i> : 2024 ± 397 vs <i>Nulip</i> : 1837 ± 222 F = 0.51 ; gl = 1,12 ; p = 0.49
	INTERACCION	p = 0.13 ; gl = 1,13 ; F = 2.86	p = 0.02 ; gl = 1,12 ; F = 6.8

TABLA 1. Número de células por cada estructura en los grupos de ovejas francesas y mexicanas, en relación a la condición fisiológica, número de partos previos y su interacción.

ESTRUCTURA		FRANCIA	MEXICO
APOM	CF	<i>Estro</i> : 413 ± 48 vs <i>Parto</i> : 255 ± 32 F = 7.4 ; gl = 1,13 ; p = 0.02	<i>Estro</i> : 633 ± 32 vs <i>Parto</i> : 94 ± 18 F = 51.9 ; gl = 1,13 ; p < 0.001
	NPP	<i>Múltip.</i> : 307 ± 40 vs <i>Nulíp.</i> : 335 ± 56 F = 0.45 ; gl = 1,13 ; p = 0.1	<i>Múltip.</i> : 228 ± 45 vs <i>Nulíp.</i> : 212 ± 65 F = 0.62 ; gl = 1,13 ; p = 0.45
	INTERACCION	p = 0.88 ; gl = 1,13 ; F = 0.02	p = 0.18 ; gl = 1,13 ; F = 2.04
NSO	CF	<i>Estro</i> : 302 ± 50 vs <i>Parto</i> : 66 ± 13 F = 29.54 ; gl = 1,13 ; p < 0.001	<i>Estro</i> : 239 ± 30 vs <i>Parto</i> : 72 ± 20 F = 19.37 ; gl = 1,13 ; p = 0.01
	NPP	<i>Múltip.</i> : 199 ± 58 vs <i>Nulíp.</i> : 123 ± 39 F = 2.95 ; gl = 1,13 ; p = 0.01	<i>Múltip.</i> : 147 ± 32 vs <i>Nulíp.</i> : 154 ± 49 F = 0.01 ; gl = 1,13 ; p = 0.93
	INTERACCION	p = 0.17 ; gl = 1,13 ; F = 2.16	p = 0.67 ; gl = 1,13 ; F = 0.19
NPV	CF	<i>Estro</i> : 129 ± 19 vs <i>Parto</i> : 60 ± 10 F = 9.3 ; gl = 1,11 ; p = 0.01	<i>Estro</i> : 101 ± 10 vs <i>Parto</i> : 50 ± 10 F = 11.3 ; gl = 1,12 ; p = 0.006
	NPP	<i>Múltip.</i> : 95 ± 23 vs <i>Nulíp.</i> : 89 ± 15 F = 0.3 ; gl = 1,11 ; p = 0.96	<i>Múltip.</i> : 77 ± 12 vs <i>Nulíp.</i> : 75 ± 15 F = 0.03 ; gl = 1,12 ; p = 0.88
	INTERACCION	p = 0.60 ; gl = 1,11 ; F = 0.28	p = 0.94 ; gl = 1,12 ; F = 0.06
AM	CF	<i>Estro</i> : 343 ± 22 vs <i>Parto</i> : 232 ± 25 F = 11.66 ; gl = 1,13 ; p = 0.005	<i>Estro</i> : 238 ± 34 vs <i>Parto</i> : 157 ± 22 F = 2.25 ; gl = 1,7 ; p = 0.18
	NPP	<i>Múltip.</i> : 252 ± 36 vs <i>Nulíp.</i> : 307 ± 19 F = 3.15 ; gl = 1,13 ; p = 0.10	<i>Múltip.</i> : 167 ± 47 vs <i>Nulíp.</i> : 2309 ± 13 F = 0.96 ; gl = 1,7 ; p = 0.36
	INTERACCION	p = 0.54 ; gl = 1,13 ; F = 0.39	p = 0.77 ; gl = 1,7 ; F = 0.9
HMB	CF	<i>Estro</i> : 239 ± 11 vs <i>Parto</i> : 187 ± 10 F = 13.69 ; gl = 1,13 ; p = 0.003	<i>Estro</i> : 202 ± 13 vs <i>Parto</i> : 107 ± 9 F = 40.21 ; gl = 1,12 ; p < 0.001
	NPP	<i>Múltip.</i> : 199 ± 14 vs <i>Nulíp.</i> : 218 ± 13 F = 2.4 ; gl = 1,13 ; p = 0.15	<i>Múltip.</i> : 158 ± 25 vs <i>Nulíp.</i> : 151 ± 17 F = 0.27 ; gl = 1,12 ; p = 0.61
	INTERACCION	p = 0.64 ; gl = 1,13 ; F = 0.23	p = 0.12 ; gl = 1,12 ; F = 2.73

TABLA 2. Densidad celular de cada estructura en los grupos de ovejas francesas y mexicanas, en relación a la condición fisiológica, número de partos previos y su interacción.

VIII. DISCUSIÓN.

En relación con los resultados obtenidos en este estudio, observamos que de manera general existe una disminución en el número de células inmunoreactivas al receptor a estradiol en las ovejas de la condición fisiológica al *parto*, con respecto a las ovejas del grupo al *estro*, lo cual es contrario al hipótesis que habíamos propuesto.

Observamos también que no existe ningún efecto del número de partos previos sobre el número de células que expresan el RE2, excepto en la interacción de la condición fisiológica y número de partos previos en el hipotálamo medio basal.

Por otra parte, encontramos que existen diferencias en el número de células IR-RE2 entre las ovejas mexicanas y las francesas en la condición fisiológica al parto. Sin embargo, al realizar la comparación por separado de las ovejas mexicanas y francesas observamos que se sigue manteniendo el efecto de la condición fisiológica, es decir, siempre existió un menor número de células en la CF al *Parto* que en la condición al *Estro*, mientras que no se encontró un efecto del número de partos previos tanto en ovejas mexicanas como en ovejas francesas.

Con estos resultados, nuestra hipótesis cambia de sentido con relación a un posible aumento en el número de células inmunopositivas al momento del parto, en las áreas relacionadas con el control de la conducta maternal en la oveja; también cambia nuestra hipótesis acerca de que animales con experiencia previa de parto también tendrían un mayor número de células IR-RE2 (a excepción del hipotálamo medio basal).

En una comparación del porcentaje de células IR en las estructuras implicadas en la CM, observamos que el número de células en el APOM y el NPV disminuye de una condición a otra, pero no en la misma proporción que en el HMB, como se observa en la figura 32, mientras que en la amígdala esta proporción no es tan grande.

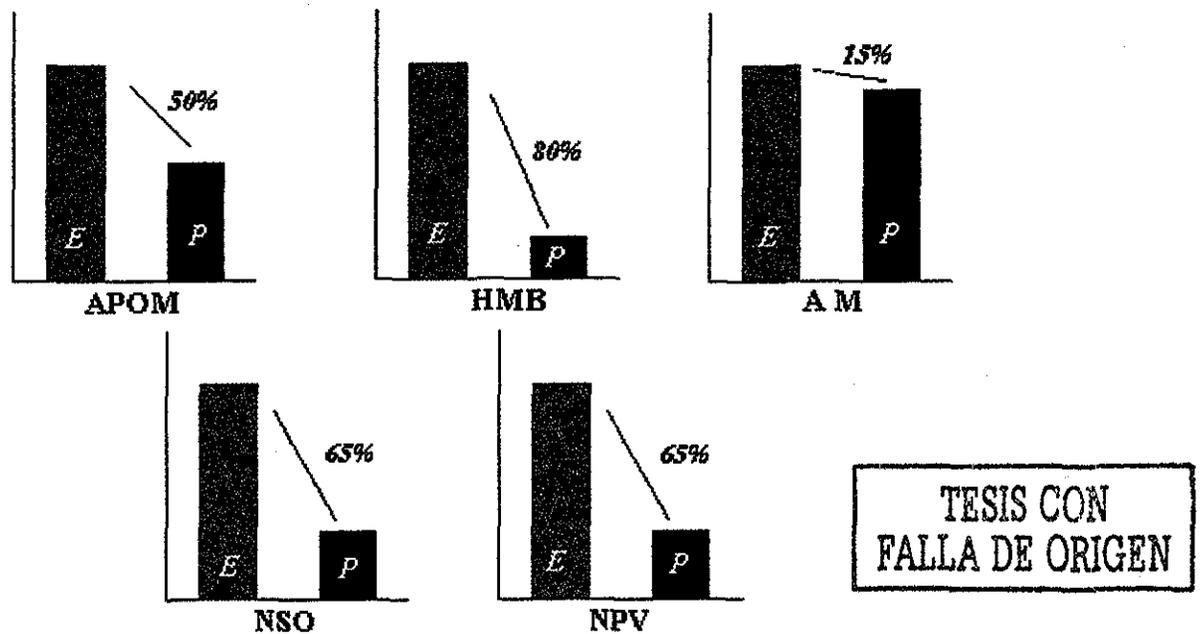


Fig. 32 Disminución en el núm. de cél. al parto en las 5 estructuras estudiadas
(expresada en porcentajes)

Observamos que en todos los casos es evidente la disminución del número de células inmunomarcadas al momento del parto. Lo cual, indica que la hipótesis es contraria a lo planteado inicialmente. Sin embargo, es probable que la hipótesis no se rechace completamente, sino que el momento en el cual se pudiera observar el mayor número de células inmunoreactivas pueda presentarse antes del momento del parto, es decir, cuando los niveles de estradiol todavía no son tan altos y que este fenómeno de “preparación del sistema” se presente antes del incremento súbito del estradiol. El momento en el cual pudiera observarse el mayor número de células inmunoreactivas pudiera presentarse entre los días 145-147 de gestación cuando los niveles de estradiol se mantienen aun bajos. Es probable que la proporción en las graficas anteriores se invierta al analizar lo que ocurre en un grupo días antes del momento de parto.

Por otro lado, observamos que a pesar de las diferencias en el número de células inmunoreactivas en ambas condiciones, siempre existió marcaje en estas estructuras, es decir, las cinco estructuras estudiadas están involucradas en la regulación del estradiol tanto en la conducta maternal como en la sexual. Sin embargo, algo que es de resaltar en los resultados obtenidos es el cambio de marcaje en los

núcleos supraóptico y paraventricular en cada una de las dos condiciones, ya que como observamos el marcaje en estos núcleos es únicamente nuclear en los grupos al *estro*, mientras que en los grupos al *parto* es citoplásmico

Posibles explicaciones

Es probable que si observamos lo que ocurre días antes del momento de parto (145-147 de gestación), cuando se presenta la disminución en los niveles de progesterona y se inicia el incremento de los niveles de estradiol, podríamos observar el efecto del aumento en el número de células IR-RE2. Ya que como hemos visto, al llegar al pico más alto de los niveles de estradiol los RE2 disminuyen, esto nos da la idea de que existe probablemente una “down-regulation” por acción misma del estradiol sobre su receptor, lo cual explicaría nuestros resultados.

Existen reportes con respecto a la acción del estradiol sobre su receptor, donde se indica que al aumentar los niveles de E2, el número de receptores a esta hormona disminuyen (Blaustein, 1993; Borrás et al., 1994; Brown et al., 1996, 1999; Lisciotto y Morrell, 1993; Saceda et al., 1988; Simerly y Young, 1991; Yuri y Kawata, 1991; Yun-li et al., 1993). Observamos que el marcaje en las hembras al *estro* es alto cuando los niveles de E2 son de aproximadamente 75pg/ml, mientras que cuando estos aumentan al parto (300 pg/ml) solo son pocas células las que se expresan, lo cual es compatible con una down-regulation para explicar los resultados de nuestro experimento.

El hecho de no haber encontrado diferencias en el número de células IR-RE2 entre las ovejas multíparas y nulíparas, podría sugerir que no sea necesario un incremento en el número de células IR-RE2 para tener un efecto más eficiente de este factor en la activación de la CM en hembras con experiencia previa, debido a que existen otros cambios fisiológicos en la oveja como por ejemplo aquellos cambios relacionados con la olfacción: cambios en el bulbo olfatorio (Kendrick et al., 1992) y en los receptores a OT (Broad *et al.*, 1999), que le permiten de alguna manera obtener una experiencia del cuidado maternal hacia su cría, sin aumentar el número de las células IR-RE2, al contrario de lo que ocurre con los roedores.

Distribución celular

Por otra parte, la distribución general de las células IR-RE2 en el hipotálamo que nosotros reportamos, es similar a estudios por inmunohistoquímica (Cintra *et al.*, 1986; DonCarlos *et al.*, 1991), autoradiografía (Pfaff y Keiner 1973; Stumpf *et al.*, 1975; Warenbourg, 1977), e hibridación *in situ* (Simerly *et al.*, 1990) para el receptor de estrógenos en otros mamíferos.

En relación con los estudios previos por inmunohistoquímica realizados en la oveja, observamos que la distribución de células IR que nosotros reportamos es muy similar a lo encontrado por Lehmann *et al.* (1993) y a Blache *et al.* (1994) en relación con la conducta sexual y el ciclo estral de la oveja. La distribución celular reportada en estos dos estudios, se extiende de regiones más anteriores, desde la banda diagonal de broca y septum, continuando en el APOM y el área hipotalámica anterior, hasta el hipotálamo medio basal en el núcleo arcuato y el hipotálamo ventromedial-ventro lateral. Sin embargo, Blache *et al.* en su estudio no encontraron células en el núcleo paraventricular en ninguno de los grupos que analizaron. Por su parte, Lehmann encontró escasas células IR-RE2 con un marcaje muy débil en el núcleo paraventricular, y en el núcleo supraóptico solamente en la porción rostral. En cambio, en nuestro estudio, se encontró un gran número de células inmunopositivas tanto en la condición al *Estro* como la de *Parto*.

También observamos que el tipo de marcaje dependió del área cerebral donde se encontrara y del estado fisiológico, como mencionamos anteriormente. Se localizaron células con marcaje nuclear únicamente en una pequeña zona de entre el NBST y el APOM, de igual forma en la región dorsal de NBST, así como en la amígdala medial. Esto es similar a lo reportado en la mayoría de los trabajos de inmunohistoquímica realizados para este receptor (Pfaff y Keiner, 1973; Stumpf, 1975; Cintra *et al.*, 1986). Estudios previos en rata (Blaustein, 1992), cobayo (Blaustein y Turcotte, 1989; Blaustein *et al.*, 1990), zarigüella (Fox *et al.*, 1991), hurón (Tobet *et al.*, 1991), hipotálamo de humano (Stopa *et al.*, 1989) y en la oveja (Blache *et al.*, 1994; Herbison *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1993) han demostrado la presencia de marcaje inmunopositivo al RE2 en citoplasma celular. Las diferencias regionales entre los grupos de células con inmunorreactividad en el citoplasma fueron muy marcadas en nuestro estudio, así mismo en relación con el estado fisiológico. El mayor número de células con marcaje citoplásmico se localizó en el hipotálamo medio basal, exactamente en el hipotálamo ventromedial-ventro lateral. Además, también se encontraron abundantes procesos celulares IR en el área preóptica medial, lo cual es similar a lo reportado por Blache *et al.*, (1994) y Lehman *et al.*, (1993).

A diferencia de estos dos estudios, nosotros encontramos un fuerte marcaje citoplásmico en la CF de *Parto* en los NPV y NSO, y esto no ha sido reportado en otros estudios. Otro tipo de marcaje que difiere de lo reportado previamente, es el de tinción en el núcleo celular pero sin tinción en el nucleolo. Este se localizó igualmente en el NSO y en el NPV, y solo estuvo presente en los grupos de ovejas al *Estro*, y éste cambió a un marcaje nuclear y citoplásmico en los grupos al *Parto*.

Una probable explicación a este cambio, podría deberse a las acciones “genómicas” del E2 en la regulación de la síntesis de otras proteínas. En este caso, por tratarse de estructuras oxitocinérgicas, podríamos suponer que la síntesis de oxitocina está siendo mediada por el estradiol. Esto lo respalda el hecho de que se ha encontrado un incremento pre-parto de los niveles de RNAm para el receptor de oxitocina en el núcleo paraventricular y el hipotálamo ventro medial (Young et al., 1997).

Por otra parte, se ha demostrado que el parto como tal, incrementa la expresión del RNAm del receptor a OT en el APOM, hipotálamo ventro medial, septum lateral, amígdala medial, NBST y BDB en hembras nulíparas, mientras que en las hembras multíparas el parto induce incrementos de este RNAm en el núcleo paraventricular y en las Islas de Calleja (Broad, et al., 1999).

Se ha demostrado que la experiencia maternal influye en la expresión de RNAm del receptor a oxitocina en varias regiones cerebrales de la oveja (Broad et al., 1999). Sin embargo, como se observa en nuestros resultados, el número de células IR-RE2 no varía de acuerdo al número de partos previos, contrariamente a lo observado en ratones, en donde la experiencia maternal permitió ver un incremento significativo en el número de células IR-RE2 en el hipotálamo ventromedial de hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Koch, 1990). Cabe aclarar que en ratones, el aumento en el número de células fue encontrado solo en estructuras relacionadas con la olfacción (corteza piriforme y entorrinal), no así en estructuras límbicas, excepto en el HMB. Esto significa que el cambio en el número de células inmunoreactivas podría más bien, estar relacionado a cuestiones olfatorias y que el probable aumento de células con RE2 se encuentre en estructuras relacionadas con la olfacción.

Con esto, existe la posibilidad de que la oveja presente un aumento en el número de células IR-RE2 en estructuras olfatorias, reforzando con ello el hecho de que la experiencia maternal en la oveja tiene un apoyo muy importante en las señales olfatorias. Pues como hemos visto, la oxitocina liberada en

el bulbo olfatorio al momento del parto (Kendrick *et al.*, 1988), es mayor en hembras multíparas que en nulíparas; además, esta liberación de OT facilita el reconocimiento del cordero, por la modulación de otros neurotransmisores (noradrenalina y acetilcolina) los cuales se ha encontrado se liberan en mayor cantidad en las hembras con experiencia. Es por ello que resulta importante analizar las estructuras relacionadas con la olfacción y ver si es aquí donde se encuentra el aumento de cél. IR en las hembras con experiencia. También resultaría interesante observar lo que ocurre en estructuras relacionadas con el aprendizaje y memoria, tales como el núcleo caudado y el hipocampo, y comprobar si estas estructuras muestran diferencias entre ovejas multíparas y nulíparas en relación con las células IR-RE2.

IX. CONCLUSIONES

La hipótesis acerca del aumento en el número de receptores a estradiol al parto sigue siendo aceptable, solo que posiblemente no haya sido el momento adecuado para realizar el análisis. Para entender el proceso que ocurre con los receptores a estradiol al momento del parto es necesario realizar pruebas en grupos de animales días antes del parto, cuando los niveles de estradiol se encuentran todavía relativamente bajos y los niveles de progesterona posiblemente ya no sean tan altos. De igual forma, nuestro grupo control sería un grupo en fase lútea (a los 11-12 días de tratamiento con progesterona, de un ciclo normal de 14 días aproximadamente) para determinar si es el estradiol mismo el que está influyendo en la posible “down-regulation” o es la progesterona la que la induce. La realización de estos grupos es una etapa indispensable antes de concluir sobre la falta de cambios específicos en la expresión del RE2 en algunas regiones relacionadas con la activación del comportamiento materno por el estradiol: en efecto sigue existiendo la posibilidad que dichos cambios hayan sido ocultados por este fenómeno de down regulation. Lo mismo aplica también para posibles diferencias entre hembras nulíparas y multíparas.

Por otra parte, sería necesario realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de las células IR-RE2 en las estructuras relacionadas con las señales olfatorias y comprobar si existe un cambio en las ovejas que han tenido experiencia de parto contra aquellas que no, para verificar si es aquí donde se encuentran dichas diferencias.

Finalmente, la presencia de un gran número de RE2 en los núcleos supraoptico y paraventricular proporcionan un posible substrato anatómo-funcional para explicar la acción sinérgica del estradiol y de la estimulación vaginocervical en la activación de la conducta maternal al parto.

Perspectivas. Para llevar a cabo un análisis más minucioso de la interacción entre el estradiol y otras hormonas, así como los cambios que se presentan de una condición fisiológica a otra, es necesario realizar con ayuda de técnicas de inmunohistoquímica (y/o hibridación *in situ*), un doble marcaje en el tejido de ovejas al parto para comprobar si la misma célula contiene tanto receptores a estradiol como a oxitocina y observar la posible interacción de estas dos hormonas al llegar el momento de parto. Y si es posible, realizar un triple marcaje con el marcador de genes tempranos c-fos, y observar si existe una activación por parte del estradiol hacia la síntesis de oxitocina.

X. REFERENCIAS

- Ahdieh HB, Mayer AD y Rosenblatt JS. 1987. Effects of brain antiestrogen implants on maternal behavior and on postpartum estrus in pregnant rats. *Neuroendocrinol.* **46**: 522-531.
- Alberts RJ y Gubernick DJ. 1990. Functional organization of dyadic and triadic parent-offspring systems. En: Krasnegor N.A. y Bridges RS (Eds). *Mammalian parenting. Biochemical, Neurobiological and behavioral determinants.* (pp. 416-440). New York: Oxford University Press.
- Alexander G. 1960. Maternal behaviour in the Merino ewe. *Proc. Aust. Soc. Anim Prod.* **3**, 105-114.
- Alexander G. 1984. Constraints to lamb survival. En: D.R. Lindsay y D.T. Pearce (Eds.), *Reproduction in Sheep.* (pp. 199-209). Canberra (Australia): Australian Wool Corporation.
- Amico JA, Seif SM, Robinson AG. 1981. Oxytocin in human plasma: correlation with neurophysin and stimulation with estrogen, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **52**: 988-993.
- Arnold GW y Morgan PD. 1975. Behaviour of the ewe and lamb at lambing and its relationship to lamb mortality. *Appl. Anim. Ethol.* **2**, 25-46.
- Arnold GW y Dudzinski ML. 1978. Maternal behaviour. En G.W. Arnold y M.L. Dudzinski (Eds.), *Ethology of Free-Ranging Domestic Animals.* (pp. 137-165). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Axelsson JF, VanLeeuwen FW. 1990. Differential localization of estrogen receptors in various vasopressin synthesizing nuclei of the rat brain. *J. Neuroendocrinol.* **2**: 209-216.
- Baulieu EE y Kelly PA. 1990. HORMONES. From molecules to disease. Chapman and Hall (Eds). New York and London.
- Blache D. 1991. Etude neurobiologique du comportement sexuel femelle et de la secretion de l'hormone luteinizante chez la brebis ovariectomisee: mecanismes centraux d'acction des steroides ovariens. Tesis de Doctorado. Universidad de Bordeaux II: Neurosciences et Pharmacologie.
- Blache D, Batailler M y Fabre-Nys C. 1994. Oestrogen receptors in the preoptico-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J. Neuroendocrinol.* **6**, 329-339.
- Blaustein JD y Olster DH. 1989. Gonadal steroid hormone receptor and social behavior. En: J. Balthazar (Ed). *Advances in comparative and environmental physiology.* (pp. 31-204). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag
- Blaustein JD y Turcotte JC. 1989a. Estradiol-induced progesterin receptor immunoreactivity is found only in estrogen receptor-immunoreactive cells in guinea pig brain. *Neuroendocrinology*, **49**: 454-461.

- Blaustein JD y Turcotte JC. 1989b. Estrogen receptor-immunostaining of neuronal cytoplasmic processes as well as cell nuclei in guinea pig brain. *Brain Res.*, **495**: 75-82.
- Blaustein AR y Porter RH. 1990. The ubiquitous concept of recognition with special reference to kin. En: M. Bekoff y D. Jamieson (Eds.), *Interpretation and Explanation in the Study of Animal Behaviour: Interpretation, Intentionality, and Communication*. (pp. 123-148). Boulder, Colorado: Westview Press.
- Blaustein JD. 1992. Cytoplasmic estrogen receptors in rat brain: immunohistochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes. *Endocrinol* **131**: 1336-1342.
- Blaustein JD. 1993. Estrogen receptor immunoreactivity in rat brain: rapid effects of estradiol injection. *Endocrinol* **132**: 1218-1224.
- Borrás M, Jarvy L, Lempereur F, El Kissi AH, Legros N, Gol-Winkler R y Leclercq R. 1994. Estradiol inducen down-regulation of estrogen receptor. Effects of various modulators of protein synthesis and expression. *J. Steroid Biochem. Molec Biol* **48**: 325-336.
- Bridges RS. 1975. Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. *Physiol Behav* **14**, 245-249.
- Bridges RS, Feder HH y Rosenblatt JS. 1977. Induction of maternal behaviors in primigravid rats by ovariectomy, hysterectomy, or ovariectomy plus hysterectomy: effect of length of gestation. *Horm. Behav* **9**, 156-169.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE y Lupini CE. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**: 8003-8007.
- Bridges RS. 1996. Biochemical basis of parental behavior in the rat. *Adv. Study Behav* **25**: 215-242
- Broad KD, Kendrick KM, Sirinathsinghji DJ y Keverne EB. 1993a. Changes in pro-opiomelanocortin and pre-proenkephalin mRNA levels in the ovine brain during pregnancy, parturition and lactation and in response to oestrogen and progesterone. *J. Neuroendocrinol.*, **5**: 711-719.
- Broad KD, Kendrick KM, Sirinathsinghji DJ y Keverne EB. 1993b. Changes in oxytocin immunoreactivity and mRNA expression in the sheep brain during pregnancy, parturition and lactation and in response to oestrogen and progesterone. *J. Neuroendocrinol.*, **5**: 435-444.
- Broad KD, Lévy F, Evans G, Kimura I, Keverne EB y Kendrick KM. 1999. Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 3725-3737.
- Brouette-Lahlou I, Godinot F y Vernet-Maury E. 1999. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. *Physiol Behav.*, **66**: 427-436.

- Brown TJ, Hochberg RB, Sielinski JE y Maclusky NJ. 1988. Regional sex difference in cells nuclear estrogen-binding capacity in the rat hypothalamus and preoptic area. *Endocrinol.* **123**: 1761-1770.
- Brown TJ, Scherz B, Hochberg RB y MacLusky NJ. 1996. Regulation of estrogen receptor concentrations in the rat brain: effects of sustained androgen and estrogen exposure. *Neuroendocrinology*, **63**: 53-60.
- Butenandt A. 1929. Uber "PROGYNON2 ein crystallisiertes, weibliches Sexualhormon. *Naturwissenschaften*. **17**: 879.
- Caba M, Beyer C, González-Marical G y Morrell JJ. Submitted 2001. Atlas of neurons that express the estrogen receptor-alpha in the forebrain of female rabbits. *J. Comp. Neurol.*
- Caba M, Poindron P, Krehbiel D, Lévy F, Romeyer A y Vénier G. 1995. Naltrexone delays the onset of maternal behavior in primiparous parturient ewes. *Pharmacol Biochem. Behav.*, **52**: 743-748.
- Caba M, Silver R, González-Mariscal G, Jiménez A y Beyer C. 1996. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in rabbit hypothalamus during estrus, late pregnancy, and postpartum. *Brain Res*, **720**, 7-16.
- Calwell JD, Brooks PJ, Jirikowski GR, Barakat AS, Lund PK y Pedersen CA. 1989. Estrogen alters oxytocin mRNA levels in the preoptic area. *J. Neuroendocrinol.* **1**: 273-278.
- Carlson NR y Thomas GJ. 1968. Maternal behavior of mice with limbic lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **66**: 731-737.
- Cintra A, Fuxe K, Harfstrand A, Agnati LF, Miller LS, Greene JL y Gustafsson JA. 1986. On the cellular localization and distribution of estrogen receptors in the rat tel- and diencephalon using monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Neurochem. Int* **8**: 587-595.
- Cohen J y Bridges RS. 1981. Retention of maternal behavior in nulliparous and primiparous rats: effects of duration of previous maternal experience. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **95**, 450-459.
- Collias NE. 1956. The analysis of socialization in sheep and goats. *Ecology*. **37(2)**: 228-239.
- Coirini H, Johnson AE y McEwen BS. 1989. Estradiol modulation of oxytocin binding in the ventro medial hypothalamic nucleus of the male and female rats. *Neuroendocrinol.* **50**: 193-198.
- Conner JR y Davis HN. 1980. Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior. *Biol. Reprod.* **23**: 994-999.
- Conrad LCA y Pfaff DW. 1976. Efferences from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. Medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.*, **169**: 185-220.
- Crowley RS, Insel TR, O'Keefe JA y Amico JA. 1993. Cytoplasmic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinol.*, **133**: 2704-2710.

- Cruz ML y Beyer C. 1972. Effects of septal lesions on maternal behavior and lactation in the rabbit. *Physiol. Behav.*, **9**: 361-365.
- Da Costa AP, Guevara-Guzman RG, Ohkura S, Goode JA y Kendrick KM. 1996. The role of oxytocin release in the paraventricular nucleus in the control of maternal behaviour in the sheep. *J. Neuroendocrinol.*, **8**: 163-177.
- De Kloet ER Voorhuis TA y Elands J. 1985. Estradiol induces oxytocin binding sites in the rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Eur. J. Pharmacol.* **118**: 185-186.
- Doisy EA, Veler CD y Thayer SA. 1929. Folliculin from the urine of pregnant women. *Am. J. Physiol.* **90**, 329-330
- Doisy EA, Veler CD y Thayer SA. 1930. The preparation of the crystalline ovarian hormone from the urine of pregnant women. *Am. J. Physiol.* **86**, 499-509.
- DonCarlos LL, Monroy E y Morrell JI. 1991. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of the female Guinea pig. *J. Comp. Neurol.* **305**: 591-612.
- Duax WL, Griffin JF Weeks CM y Wawrzak Z. 1988. The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J. Steroid Biochem.* **31**, 481-492.
- Ehret G. y Buckenmaier J. 1994. Estrogen receptors occurrence in the female mouse brain: effect of maternal experience, ovariectomy, estrogen and anosmia. *J. Physiol. Paris*, **88**: 315-329.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Sci.* **240**, 889-895.
- Fabre-Nys C y Martin GB. 1991. Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe. *J. Endocrinol.* **130**, 367-379.
- Fahrbach SE, Morrell JI y Pfaff DW. 1986. Identification of medial preoptic neurons that concentrate estradiol and project to the midbrain in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **247**: 364-382.
- Fleischer S y Slotnick BM. 1978. Disruption of maternal behavior in rats with lesions of the septal area. *Physiol. Behav.*, **21**: 189-200.
- Fleming AS y Rosenblatt JS. 1974. Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **86**, 957-972.
- Fleming A, Vaccarino F, Tambosso L y Chee P. 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Sci.*, **203**: 372-374.
- Fleming AS, Vaccarino F y Luebke C. 1980. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol. Behav.*, **25**: 731-743.

- Fleming AS y Sarker J. 1990. Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. *Physiol. Behav.* **47**, 1165-1173.
- Fleming AS, Korsmit M y Deller M. 1994. Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: effects of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiol.* **22**: 44-53.
- Fleming AS, Kuchera C, Lee A y Winocur G. 1994. Olfactory-based social learning varies as a function of parity in female rats. *Psychobiol.* **22**: 37-43.
- Fletcher IC y Lindsay DR. 1971. Effect of oestrogen on oestrous behaviour and its variation with season in the ewe. *J. Endocrinol.*, **50**: 685-696.
- Fox CA, Ross RL, Handa RJ y Jacobson CD. 1991. Localization of cells containing estrogen receptors-like immunoreactivity in the brazilian opossum brain. *Brain Res.* **546**: 96-105
- Frank RT, Frank ML, Gustavson RG y Weyerts WW. 1925. Demonstration of the female sex hormone in the circulating blood. I. Preliminary report. *JAMA.* **85**, 510.
- Franz JR, Leo RJ, Steuer MA y Kristal MB. 1986. Effects of hypothalamic knife cuts and experience on maternal behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, **38**: 629-640.
- Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Harfstrand A, Wikstrom AC, Okret S, Zoli M, Miller LS, Greene JL y Gustafsson JA. 1987. Studies on cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor and estrogen receptor immunoreactivity in central nervous system of the rat and their relationship to monoaminergic and peptidergic neurons of the brain. *J. Steroid Biochem.* **27**: 159-170.
- Geist V. 1971. Behavior of ewes and lambs. En G.B. Schaller (Ed.), *Mountain Sheep*. (pp. 239-255). Chicago: University of Chicago Press.
- Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP y Lucion AB. 1997. Hypothalamic paraventricular nucleus, oxytocin, and maternal aggression in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **807**: 606-609.
- Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP y Lucion AB. 1998. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol. Behav.*, **63**: 351-359.
- Giordano AL, Siegel HI y Rosenblatt JS. 1989. Nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of pregnancy-terminated rats: Correlation with the onset of maternal behavior. *Neuroendocrinol.* **50**(3): 248-258.
- Giordano AL, Adhieh HB, Mayer AD, Siegel HI y Rosenblatt JS. 1990. Cytosol and nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of female rats during pregnancy and ovariectomized, nulliparous rats after steroid priming: Correlation with maternal behavior. *Horm. Behav.* **24**(2): 232-255.

- Gonzalez A. 1999. Diferencias sexuales en la activación de neuronas productoras del factor liberador de gonadotropinas en el cerebro anterior del conejo en relación con la cópula. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver.
- González-Mariscal G y Poindron P. aceptado 2002. *Parental Care*. En : Hormones, Brain and Behavior. Pfaff D (Ed). Academic Press: New-York.
- Gordon K y Siegmann M. 1991. Suckling behavior of ewes in early lactation. *Physiol. Behav.*, **50**: 1079-1081.
- Grubb P y Jewel PA. 1966. Social grouping and home range in feral Soay sheep. *Symp. Zool. Soc London*. **18**:179-210.
- Herbison AE, Theodosis DT. 1992. Localization of estrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neurosci*. **50**: 283-298.
- Herbison AE, Robinson JE y Skinner DC. 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinol*. **57**, 751-759.
- Hernández H. 2001. Análisis de la conducta de amamantamiento en cabras y ovejas durante la lactancia y sus relaciones con la fisiología materna. Tesis de Doctorado. Centro de Neurobiología. Campus UNAM-UAQ, Juriquilla Qro.
- Herscher L, Richmond JB y Moore AU. 1963. Maternal behavior in sheep and goats. En: *Maternal behavior in Mammals*. Rheinglod HL (Ed). 203-231. John Wiley and Sons Inc. New-York
- Horvath TL, Garcia-Segura LM y Naftolin F. 1997. Lack of gonadotropin-positive feedback in the male rat is associated with lack of estrogen-induced synaptic plasticity in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinol*. **65**: 136-140.
- Hui-Yun Li, Blaustein JD, De Vries y Wade GN. 1993. Estrogen receptor immunoreactivity in hamster brain: preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Brain Res*. **631**: 304-312.
- Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA y Sawyer CH. 1980. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. *Brain Res.*, **194**: 471-478.
- Jakubowski M y Terkel J. 1985. Establishment and maintenance of maternal responsiveness in postpartum Wistar rats. *Anim. Behav*. **34**, 256-262.
- Jensen EV y DeSombre ER. 1972. Mechanism of action of the female sex hormones. *Annu. Rev. Biochem*. **41**, 203-230.
- Jensen EV y Jacobsen HI. 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm Res.* (Pincus G, Eds) **XVIII** :387-414.

- Jirikowski GF, Caldwell JD, Pedersen CA y Stumpf DW. 1988. Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neurosci.* **25**: 237-248.
- Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R y Lieberman ME. 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Perspect.* **61**, 97-110.
- Kendrick KM, Keverne EB, Baldwin BA y Sharman DF. 1986. Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labour, parturition, vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. *Neuroendocrinol.* **44**: 149-156.
- Kendrick KM, Keverne EB y Baldwin BA. 1987. Intracerebroventricular oxytocin stimulates maternal behaviour in the sheep. *Neuroendocrinol.* **46**: 56-61.
- Kendrick KM, Keverne EB, Shapman C y Baldwin BA. 1988. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gama-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. *Brain Res.* **442**, 171-174.
- Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C y Baldwin BA. 1988. Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating. *Brain Res.* **439**: 1-10.
- Kendrick KM y Keverne EB. 1989. Effects of intracerebroventricular infusions of naltrexone and phentolamine on central and peripheral oxytocin release and on maternal behaviour induced by vaginocervical stimulation in the ewe. *Brain Res.* **505**: 329-332.
- Kendrick KM y Keverne EB. 1991. Importance of progesterone and estrogen priming for the induction of maternal behavior by vaginocervical stimulation in sheep: Effects of maternal experience. *Physiol. Behav.* **49(4)**: 745-750.
- Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR y Goode JA. 1991. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of oxytocin and vasopressin during parturition and vaginocervical stimulation in the sheep. *Brain Res. Bull.* **26**, 803-807.
- Kendrick KM y Keverne EB. 1992. Control of synthesis and release of oxytocin in the sheep brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **652**, 102-121.
- Kendrick KM, Da Costa AP, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Lévy F y Keverne EB. 1997. Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Res. Bull.* **44**: 383-395.
- Keverne EB, Lévy F, Poindron P y Lindsay DR. 1983. Vaginal stimulation: an important determinant of maternal bonding in sheep. *Sci.* **219**, 81-83.
- Keverne EB y Kendrick KM. 1991. Morphine and corticotrophin-releasing factor potentiate maternal acceptance in multiparous ewes after vaginocervical stimulation. *Brain Res.* **540**: 55-62.

- King WJ y Greene GL. 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogene receptor in the nuclei of target cells. *Nature*. **307**:745-749.
- Koch M y Ehret G. 1989. Estradiol and parental experience, but not prolactin, are necessary for ultrasound recognition and pup-retrieving in the mouse. *Physiol. Behav.*, **45**: 771-776.
- Koch M. 1990. Effects of treatment with estradiol and parental experience on the number and distribution of estrogen-binding neurons in the ovariectomized mouse brain. *Neuroendocrinol.* **51**: 505-514.
- Krehbiel D, Poindron P, Lévy F y Prud'Homme MJ. 1987. Peridural anesthesia disturbs maternal behavior in primiparous and multiparous parturient ewes. *Physiol. Behav.* **40**, 463-472.
- Lahulou-Kassi A, Breger YM, Bradford GE, Boukhliq R, Tibary A, Derqaqui L y Boujenane I. 1989. Performance of the D'Man and Sardi Sheep on accelerated lambing. En: Fertility. Litter size, postpartum anoestrus and puberty. *Small Ruminant Research.* **2**:225-239.
- Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M y Pfaff DW. 1991. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a fuction of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinol.* **129**: 3180-3186.
- L'Heureux N, Lucherini M, Festa-Bianchet M y Jorgenson JT. 1995. Density-dependent mother-yearling association in bighorn sheep. *Anim. Behav.* **49**, 901-910.
- Le Neindre P, Poindron P y Delouis C. 1979. Hormonal induction of maternal behavior in non-pregnant ewes. *Physiol. Behav.*, **22**: 731-734.
- Lehmann MN, Ebling JP, Moenter SM y Karsh FJ. 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinol.* **133**, 876-886.
- Lévy F, Keverne EB, Piketty V y Poindron P. 1990. Physiological determinism of olfactory attraction for amniotic fluids in sheep. En D.W. MacDonald, D. Müller-Schwarze y N. S.E. (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates, Vol. 5.* (pp. 162-165). Oxford (G.B.): Oxford University Press.
- Lévy F, Gervais R, Kindermann U, Orgeur P y Piketty V. 1990. Importance of beta-noradrenergic receptors in the olfactory bulb of sheep for recognition of lambs. *Behav. Neurosci.* **104**, 464-469.
- Lévy F, Kendrick KM, Keverne EB, Piketty V y Poindron P. 1992. Intracerebral oxytocin is important for the onset of maternal behavior in inexperienced ewes delivered under peridural anesthesia. *Behav. Neurosci.*, **106**: 427-432.
- Lévy F, Poindron P y Le Neindre P. 1983. Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiol. Behav.*, **31**: 687-692.
- Lévy F, Kendrick K, Keverne EB, Porter RH y Romeyer A. 1996. Physiological, sensory and experiential factors of parental care in sheep. *Adv. Study Behav.* **25**, 385-473.

- Lisciotta CA y Morrell JL. 1993. Circulating gonadal steroid hormones regulate estrogen receptor mRNA in the male rat forebrain. *Mol. Brain Res.* **20**: 79-90
- Loewe S. 1925. Nachweis brusterzeugender Stoffe im weimblinchen. *Klin Wochenschr.* **4**, 1407-1408.
- Loewe S. y Lange F. 1926. Der Gehalt des Frauenharns an brusterzeugenden Stoffen in Abhängigkeit von ovariellen Zyklus. *Klin Wochenschr.* **5**, 1038-1039.
- Louault F. 1983. Comment les relations mère-jeune influencent-t-elles la reprise post-partum de l'activité cyclique de reproduction chez la brebis Préalpes du Sud?, pp. 54. Diplôme d'Etudes Approfondies, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France.
- Mauléon P y Dauzier L. 1965. Variations de durée de l'anoestrus de lactation chez les brebis de race Ile-de-France. *Ann. Biol. Anim. Biochim Biophys.*, **5**: 131-143.
- McEwen BS y Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.*, **20**: 279-307.
- Miceli MO, Fleming AS y Malsbury CW. 1983. Disruption of maternal behaviour in virgin and postparturient rats following sagittal plane knife cuts in the preoptic area-hypothalamus. *Behav. Brain Res.*, **9**: 337-360.
- Miller FD, Ozimek G, Milner RJ y Bloom FE. 1989. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2468-2472.
- Morgan HD, Watchus JA, Milgram NW y Fleming AS. 1999. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behav Brain Res.*, **99**: 61 - 73.
- Noirot E. 1972. The onset and development of maternal behavior in rats, hamsters and mice. *Adv. Study Behav.*, **4**: 107-145.
- Numan M. 1974. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **87**: 746-759.
- Numan M, Rosenblatt JS y Komisaruk BR. 1977. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **91**: 146-164.
- Numan M y Callahan EC. 1980. The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, **25**: 653-665.
- Numan M y Smith HG. 1984. Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of the preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behav. Neurosci.* **98**(4): 712-727.
- Numan M y Corodimas KP. 1985. The effects of paraventricular hypothalamic lesions on maternal behavior in rats. *Physiol. Behav.*, **35**: 417-425.

- Numan M, Morrell JJ y Pfaff DW. 1985. Anatomical identification of neurons in selected brain regions associated with maternal behavior deficits induced by knife cuts of the lateral hypothalamus in rats. *J. Comp. Neurol.*, **237**: 552-564.
- Numan M. 1988. Neural basis of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinol*, **13**: 47-62.
- Numan M. 1990a. Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats. *Behav. Neural Biol.*, **53**: 284-290.
- Numan M. 1990b. Neural control of maternal behavior. En: N.A. Krasnegor y R.B. Bridges (Eds.), *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinant*. (pp. 231-259). New-York: Oxford University Press.
- Numan M. 1994. Maternal behavior. En E. Knobil y J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* Vol. 2. (pp. 221-302). New York: Raven Press.
- Orchinik M y McEwen BS, 1995. Rapid actions in the brain, a critique of genomic and non-genomic mechanisms. En: Wehling M (Ed) *Genomic and non-genomic effects of aldosterone*. CRC Press, Boca Raton, Fl, pp.77-108.
- Orpen BG y Fleming AS. 1987. Experience with pups sustains maternal responding in postpartum rats. *Physiol. Behav.* **40**, 47-54.
- Oxley G y Fleming AS. 2000. The effects of medial preoptic area and amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat. *Dev. Psychobiol.*, **37**: 253-265.
- Pfaff DW y Keiner M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **141**: 121-158.
- Pfaff DW. 1980. Estrogens and Brain function. Springer-Verlag, New-York.
- Poindron P y Le Neindre P. 1979. Les relations mère-jeune chez les ruminants domestiques et leur conséquence en production animale. *Bulletin Technique du Département de Génétique Animale*, **29-30**: 33-57.
- Poindron P, Martin GB y Hooley RD. 1979. Effects of lambing induction on the sensitive period for the establishment of maternal behaviour in sheep. *Physiol. Behav.* **23**, 1081-1087.
- Poindron P y Le Neindre P. 1980. Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe. *Adv. Study Behav.* **11**, 75-119.
- Poindron P, Le Neindre P, Raksanyi I, Trillat G y Orgeur P. 1980a. Importance of the characteristics of the young in the manifestation and establishment of maternal behaviour in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* **20**, 817-826.

- Poindron P, Cognie Y, Gayerie F, Orgeur P, Oldham CM y Ravault JP. 1980b. Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. *Physiol. Behav.* **25**, 227-236.
- Poindron P, Raksanyi I, Orgeur P y LeNeindre P. 1984. Comparaison du comportement maternel en bergerie á la parturition chez des brebis primipares ou multipares de race Romanov, Pré-alpes du Sud et Ile-de-France. *Genétique Selection, Evolution.* **16(4)**: 503-522.
- Poindron P, Lévy F y Krehbiel D. 1988. Genital, olfactory, and endocrine interactions in the development of maternal behaviour in the parturient ewe. *Psychoneuroendocrinol.* **13**, 99-125.
- Poindron P, Caba M, Gomora Arrati P, Krehbiel D y Beyer C. 1993. Réactions à la séparation sociale et à la privation du jeune chez la brebis et conséquences pour l'entretien des ongulés domestiques à la parturition. En: *Compte-rendu de l'AIP Comportement et Adaptation aux contraintes de l'Élevage*. In "Un point sur - Comportement et adaptation des animaux domestiques aux contraintes de l'élevage: bases techniques du bien-être animal", (M. Picard, R.H. Porter y J.P. Signoret, Eds.), pp. 167-177. INRA Edition, Saint Malo 6-7 Mai 1993.
- Poindron P, Nowak R, Lévy F, Porter RH y Schaal B. 1993. Development of exclusive mother-young bonding in sheep and goats. *Oxf Rev Reprod Biol*, **15**: 311-364.
- Poindron P, Delgadillo JA, Flores MJ, Hernández H y Flores JA. 1996. Suckling behaviour in criolla goats kidding in winter or spring in northern Mexico and its relation with postpartum anoestrous. En: *VI International Conference on Goats*, Vol. 2, pp. 818. International Academic Publisher, Beijing, China
- Power RF, Conneely OM y O'Malley BW. 1992. New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 318-323.
- Programa estadístico SYSTAT. Versión 7.0 para Windows. 1997. SPSS Inc 3/97. Standard Version
- Rainbow IC, Parson B, MacLusky Nj y McEwen BS. 1982. Estradiol receptors levels in rat hypothalamus and limbic nuclei. *J. Neurosci.* **2**: 1439-1445.
- Richard P. 1967. Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis. INRA
- Romeyer A y Poindron P. 1992. Early maternal discrimination of alien kids by post-parturient goats. *Behav. Processes.* **26**, 103-112.
- Rosenblatt JS y Lehmann DS. 1963. Maternal behavior in the laboratory rat. En H.L. Rheingold (Ed.), *Maternal Behavior in Mammals*. (pp. 8-57). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Rosenblatt JS. 1969. The development of maternal responsiveness in the rat. *Am J Orthopsychiatry*, **39**: 36-56.
- Rosenblatt JS, Siegel HI y Mayer AD. 1979. Progress in the study of maternal behavior in the rat: hormonal, nonhormonal, sensory, and developmental aspects. *Adv. Study Behav.*, **10**: 225-311.

- Rosenblatt JS y Siegel HI. 1981. Factors governing the onset and maintenance of maternal behavior among nonprimate Mammals. En D.J. Gubernick y P.H. Klopfer (Eds.), *Parental Care in Mammals*. (pp. 13-76). New-York: Plenum Press.
- Rosenblatt JS, Mayer AD y Giordano AL. 1988. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinol.* **13**(1-2): 29-46.
- Rowell TE. 1991. Till death us do part: long-lasting bonds between ewes and their daughters. *Anim Behav.* **42**, 681-682.
- Saceda M, Lippman ME, Chambon P, Linsey RL, Ponglykitmongkol M, Puente M y Martin MB. 1988. Regulation of estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Mol. Endocrinol.* **2**: 1157-1162.
- Sar M y Parikh I. 1986. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem* **24**: 497-503
- Sarkar DK y Gibbs DM. 1984. Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessel of rats. *Neuroendocrinol.* **39**: 481-483.
- Sawchenko PE y Swanson LW. 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **205**: 260-272.
- Sheehan IP y Numan M. 1997. Microinjection of the tachykinin neuropeptide K into the ventromedial hypothalamus disrupts the hormonal onset of maternal behavior in female rats. *J Neuroendocrinol* , **9**: 677-687.
- Sheehan IP, Cirrito J, Numan MJ y Numan M. 2000. Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* , **114**: 337-352.
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* **304**: 345-347.
- Silverman AJ, Levine I y Witkin JW. 1994. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: Kobil E., Neill JD (Eds). *The physiology of reproduction*. **I** :1683-1709. Raven Press, New York.
- Simonian SX y Herbison AE. 1997. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* , **9**: 803-806.
- Simmerly RB, Chang C, Muramatsu M y Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **294**: 76-95.

- Simerly RB y Young BJ. 1991. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* **5**: 424-432
- Skinner MJ, Sim JA y Herbison AE. 1999. Detection of estrogen receptor alfa and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Endocrinol.* **140**: (11) 5195-5201.
- Slotnick BM y Nigrosh BJ. 1975. Maternal behavior of mice with cingulate cortical, amygdala, or septal lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **88**: 118-127.
- Smith FV, Van-Toller C y Boyes I. 1966. The "critical period" in the attachment of lambs and ewes. *Anim. Behav.* **14**, 120-125.
- Sofroniew MV. Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. En: *Neurotransmitters in action*. (pp. 329-337).
- Stabenfeldt GH. 1974. The role of progesterone in parturition: premature, normal, prolonged gestation. En: M.J. Bosc, R. Palmer y C. Sureau (Eds.), *Avortement et Parturition Provoqués*. (pp. 97-122). Paris: Masson
- Stevens D, Alexander G y Lynch JJ. 1982. Lamb mortality due to inadequate care of twins by Merino ewes. *Appl. Anim. Ethol.*, **8**: 243-252.
- Stopa EG, Hauser SH, King JC y Blaustein JD. 1989. Estrogen receptor immunoreactivity in the human hypothalamus. *Neurosci Abstr.* **25**: 627
- Stumpf W. 1968. Estradiol concentrating neurons: topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography. *Sci.* **162**: 1001-1003
- Stumpf W. 1970. Estrogen-neurons and estrogen systems in the paraventricular brain. *Am. J. Anat.* **129**: 207-218.
- Stumpf W y Sar M. 1975. Hormone-architecture of Mouse brain with ³H-estradiol *Anatomical Neuroendocrinology*. En: Karger y Basel (Eds). *Int. Conf. Neurobiology of CNS-Hormone interactions*, (pp. 82-103). EUA: Chapel Hill.
- Stumpf W, Sar M. y Keefer D. 1975. Atlas of estrogen target cells in rat brain. *Anatomical Neuroendocrinology*. En: Karger y Basel (Eds). *Int. Conf. Neurobiology of CNS-Hormone interactions*, (pp. 104-119). EUA: Chapel Hill.
- Terlecki LJ y Sainsbury RS. 1978. Effects of fimbria lesions on maternal behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, **21**: 89-97.
- Terqui M. 1974. Les oestrogènes au cours de la gestation et de la parturition chez la truie et la brebis. En: M.J. Bosc, R. Palmer y C. Sureau (Eds.), *Avortement et Parturition provoqués*. (pp. 71-79). Paris: Masson et Cie.

- Terrazas A. 1999. Estudio de la comunicación acústica madre-cría en ella oveja y su papel en el reconocimiento interindividual temprano. Tesis de Doctorado. Centro de Neurobiología. Campus UNAM-UAQ Juriquilla. QRO.
- Terrazas A, Ferreira G, Poindron P, Lévy F, Nowak R, Serafin N, Orgeur P y Soto R. 1998. Ewes recognize their lambs within the first day post partum without the help of olfactory cues.
- Thind KK, Goldsmith PC. 1997. Expression of estrogen and progesterone receptors en glutamate and GABA neurons of the pubertal female monkey hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 65: 314-324.
- Tobet SA, Basham M, Fox IO, Baum MJ. 1991. Estrogen receptor immunoreactive neurons int he forebrain of adult male and female ferrets. 21st Annual meeting of society for Neuroscience, New Orleans, LA, 1991 (Abstract 561.20)
- Tsai MJ y O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451-486.
- Voisin DL, Chapman C, Poulain DA y Herbison AE. 1994. Extracellular GABA concentrations in rat supraoptic nucleus during lactation and following haemodynamic changes: an in vivo microdialysis study. *Neurosci.* 63: 547-558.
- Wagner CK y Morrell JI. 1996. Levels of estrogen receptor immunoreactivity are altered in behaviorally-relevant brain regions in female rats during pregnancy. *Brain Res Mol Brain Res*, 42: 328-336.
- Warembourg M. 1977. Radioautographic localization of estrogen receptor concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea pig. *Brain Res.* 123: 357-362.
- Warembourg M, Jolivet A y Milgrom E. 1989. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.*, 480: 1-15
- Warembourg M, Leroy D, Peytevin J, y Martinet L. 1998. Estrogen receptor an progesterone receptor-immunoreactive cells are not co-localized with gonadotrophin-releasing hormone en the brain of female mink (*Mustela vison*). *Cell Tissue Res.* 291: 33-41
- Welshons WV, Lieberman ME y Gorski J. 1984. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature (Lond.)*. 307: 747-749.
- Wood R. 1997. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm. and Behav* 32: 40-45.
- Yamaguchi K, Akaishi T y Negoro H. 1979. Effect of the estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopresin in ovariectomized rats. *Endocrinol. Jap.* 26: 197-205
- Yeo JA y Keverne EB. 1986. The importance of vaginal-cervical stimulation for maternal behaviour in the rat. *Physiol. Behav.* 37, 23-26.

- Young LJ, Winslow JT, Wang Z, Gingrich B, Guo Q, Matzuk MM y Insel IR. 1997. Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. *Horm. Behav.*, **31**: 221-231
- YuriK, Kawata M. 1991. The effect of estrogen on the estrogen receptor-immunoreactive cells in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res.* **548**: 50-54.
- Zondek B. 1928. Darstellung des weiblichen Sexualhormon aus dem Harn, insbesondere dem Harn von Schwangeren. *Klin Wochenschr.* **7**, 485-486.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de ovejas que manifestaron receptividad a corderos recién nacidos, y concentraciones plasmáticas del estradiol y progesterona en el mismo periodo.	7
Figura 2. Estructura molecular del estradiol.	12
Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de los estrógenos sobre su receptor para la síntesis de proteínas.	13
Figura 4. Diagrama que muestra las vías que van del órgano vomeronasal hacia la amígdala medial, núcleo base de la stria terminal y APOM.	19
Figura 5. Microfotografía (10X) que muestra la inmunoreactividad al RE2 en la amígdala medial.	37
Figura 6a y 6b. Inmunoreactividad en el núcleo supraóptico.	38
Figura 7. Marcaje nuclear con reacción en el citoplasma y procesos celulares Área preóptica media.	39
Figura 8a y 8b. Secciones control de la reacción de inmunohistoquímica.	40
Figura 9. Área preóptica media	43
Figura 10. Núcleo supraóptico de los grupos multíparas y nulíparas al <i>Estro</i> (10X).	44
Figura 11. Núcleo supraóptico, de los grupos multíparas y nulíparas al <i>Parto</i> (10X).	44
Figura 12. Núcleo Paraventricular (grupos: multíparas y nulíparas al <i>Estro</i>).	45
Figura 13. Núcleo Paraventricular (grupos: multíparas y nulíparas al <i>Parto</i>).	45
Figura 14a y 14b. Amígdala medial (todos los grupos).	46
Figura 15. Distribución de las células IR-RE2 en el hipotálamo medio basal	47
Figura 16. Hipotálamo ventromedial-ventro lateral con abundantes procesos celulares inmunomarcados (ovejas multíparas y nulíparas al <i>Estro</i>).	48
Figura 17. Inmunoreactividad en el núcleo arcuato.	48
Figura 18. Número total de células inmunorreactivas a RE2 en APOM	50
Figura 19. Densidad de células por mm ² en el APOM.	50

Figura 20 (a, b, c, d). Ejemplos de células inmunopositivas a RE2 de los 4 grupos experimentales (4X, Área preóptica).	51
Figura 21. Número de células inmunorreactivas a RE2 en NSO.	53
Figura 22. Densidad de células IR-RE2 en el núcleo supraóptico	53
Figura 23. Número de células inmunorreactivas a RE2 en NPV.	55
Figura 24. Densidad de cél. IR-RE2 en el Núcleo Paraventricular	55
Figura 25. Número de células inmunorreactivas a RE2 en AM.	57
Figura 26. Densidad de cél. IR-RE2 en la Amígdala Medial	57
Figura 27. Número de células inmunorreactivas a RE2 en HMB.	59
Figura 28. Densidad de cél. IR-RE2 en el HMB.	59
Figura 29. Número de células IR-RE2 en el APOM en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto.	61
Figura 30. Número de células IR-RE2 en la Amígdala medial en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto.	61
Figura 31. Número de células IR-RE2 en el HMB en relación con la variable País, en la Condición fisiológica Parto.	62
Figura 32. Disminución en el núm. de cél. al parto en las 5 estructuras estudiadas (porcentajes)	67
Tabla 1. Número de células de cada estructura en los grupos de ovejas francesas y mexicanas, en relación a la condición fisiológica, número de partos previos y su interacción.	63
Tabla 2. Densidad celular de cada estructura en los grupos de ovejas francesas y mexicanas, en relación a la condición fisiológica, número de partos previos y su interacción.	64