



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA O DE  
LA SUSPENSIÓN DEL MISMO SOBRE LA RESPUESTA  
DE ESTRÉS EN OVEJAS**

**ALINE FREITAS DE MELO**

**TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
2013**





**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA O DE  
LA SUSPENSIÓN DEL MISMO SOBRE LA RESPUESTA  
DE ESTRÉS EN OVEJAS**

**ALINE FREITAS DE MELO**

---

**Georget Banchemo; MSc, PhD**  
**Directora de Tesis**

---

**Maria José Hötzel; MSc, PhD**  
**Co-directora de Tesis**

---

**Juan Pablo Damián; MSc**  
**Co-director de Tesis**

**2013**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Celia Tasende; DMTV, MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República-Uruguay**

**Maria Cecilia Scorza; Lic. Biol., MSc, PhD  
Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable-Uruguay**

**Agustín Orihuela; Ing. Agr., MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Autónoma del Estado de México-  
México**

# ACTA DE DEFENSA DE LA TESIS

# INFORME DEL TRIBUNAL

*‘I give her all my love,  
That's all I do  
And if you saw my love  
You'd love her too,  
I love her....  
...A love like ours  
Could never die  
As long as  
I have you near me... ‘*

John Lennon y Paul McCartney

Dedico esta Tesis de Maestría a **AUJ**...

Esta unidad de amor que vive en dos para ser uno.

## AGRADECIMIENTOS

A Georget Banhero por haberme apoyado durante el proceso de formación de la Maestría, y por haber permitido que los trabajos de la Tesis se realizaran en INIA La Estanzuela. Muchas gracias por tus aportes en la redacción de la Tesis y del artículo.

A Maria Hötzel por aportar con su visión científica, la que complementó ampliamente el resultado final de este trabajo. Por su atención continua, sus respuestas instantáneas por correo. Por haber hecho lo máximo posible para que la distancia no afectara la calidad de sus contribuciones. Muchas gracias por tus aportes en la redacción de la Tesis y del artículo.

A Juan Pablo por su continua disposición para ayudar, por darme independencia de trabajo y confianza. Sobre todo por su lado humano, por la amistad y por haber estado presente apoyándome en el proceso de adaptación al Uruguay. Muchas gracias por tus aportes en la redacción de la Tesis y del artículo.

A Rodolfo Ungerfeld por enseñarme a hacer ciencia desde que lo conocí, por su visión amplia al responder una pregunta experimental, por su paciencia en enseñar, su dedicación y apertura a visiones externas. Muchas gracias por tus aportes en la redacción de la Tesis y del artículo.

Al tribunal de Tesis: Celia Tasende, Cecília Scorza y Agustín Orihuela por aportar con sus visiones complementarias en la evaluación de la Tesis. A Celia y Cecilia especialmente por las sugerencias en la redacción y encare de la Tesis. A todos ustedes muchas gracias.

Al Laboratorio de Fisiología por colaborar de muchas formas en los trabajos de mi Maestría, y por proporcionar un ambiente de discusión científica. Muchas gracias a Matías Villagrán, Florencia Baracochea, Julia Giriboni, Fernando Fumagalli, Lorena Lacuesta y Milton Pintos.

Al Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, por la formación proporcionada y por la disponibilidad de cursos que sumaron inmensamente en mi formación.

Al tribunal del Proyecto de Tesis: Elsa Garófalo, Jorge Gil y Annabel Ferreira por los aportes realizados durante la discusión. A Elsa especialmente por los aportes en parte del diseño experimental y estructura del proyecto.

A todos que contribuyeron para que estos experimentos pudiesen llevarse a cabo con compromiso y responsabilidad: Florencia Baracochea, Gabriela Magri, Magdalena Cassarino, Laura Morena, Marcela Canabal, Sofia, Damián, Alberto, Santuza Hermes, Patrica Abraham y Josefina Tourón.

A los docentes y funcionarios del Área de Bioquímica por compartir un espacio de trabajo en común. A Celia especialmente por apoyarme durante todo mi proceso de formación, y en todos los sentidos de mi crecimiento personal y profesional, por sus contribuciones para la defensa del proyecto de Tesis, sobre todo por sus valores humanos. A Cecília López y Rafael Souto por la amistad y compañerismo, a Marcelo



Rodríguez-Piñón por el compañerismo y por los aportes en la presentación del proyecto y de la Tesis, y a Perla Rubianes por el cariño.

A Área de Bioquímica, y a los Laboratorios de Técnicas Nucleares y de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria, y al Laboratorio de Calidad de Leche de INIA-Estanzuela, por ayudar en los análisis sanguíneos y de la leche.

A la Universidade do Estado de Santa Catarina, por proporcionarme formación en Medicina Veterinária, especialmente a todos los docentes y amigos por el aprendizaje y apoyo.

À minha família de sangue, especialmente ao meu pai e à minha mãe, que me ensinaram que o importante na vida é responder um sim a pergunta: Estas feliz? E que se a resposta é negativa, tens que procurar até encontrar um sim! E que para isso tens que sentir a vida com amor e emoção. Agradeço também às minhas irmãs mais velhas, Denise e Carina, que sinto a falta todos os dias, que compartilharam comigo muitos momentos lindos, e que são minhas referencias de confiança e apoio. Muito obrigada pai, mãe e irmãs, por apoiar-me em todas as decisões importantes de minha vida, àquelas dadas por dizer sim à pergunta que leva a felicidade.

Às minhas eternas amigas Larissa Komatti, Marjory Silva e Marina Ferreira.

A mí familia uruguaya, Clara, Pamela y Mariana, por hacerme sentir querida, y hacerme sentir a Uruguay como mí primera casa.

Otra vez a Rodolfo Ungerfeld, y especialmente a él, persona que me inspira la poesía a la hora de agradecer:

El salón está lleno, todas vestidas de fiesta  
Las letras bailan juntas, con pasos alegres, saltan!  
Los dedos no logran acertar el teclado...  
Cuatro letras se abrazan y bailan...  
Parece que siempre anduvieran juntas,  
Que ensayaran los pasos de la música  
MROA, MRAO, MORA, ROMA, AMOR!  
Qué lindo el salón, que linda la mente...  
La canción para, las letras se unen, se ordenan  
La mente sigue en fiesta, está contenta!  
Ahora los dedos pueden escribir:

Muchas gracias mí amor,  
Por llenar mí vida con la energía de tu personalidad, por tu apoyo incondicional, buen humor, compañerismo, inquietud de vivir...  
Por enseñarme lo que es importante en la vida, y a mejorar continuamente.  
Por abrir mí mente y corazón, mostrándome que el otro hace parte de un mismo sistema, que es inseparable.  
Muchas gracias por todo eso y por un mucho más inexpresable...  
Te amo.

# ÍNDICE

|   | Páginas     |
|---|-------------|
| <b>Dedicatoria.....</b>   | <b>i</b>    |
| <b>Agradecimientos.....</b>   | <b>ii</b>   |
| <b>Índice.....</b>  | <b>iv</b>   |
| <b>Índice de figuras.....</b>   | <b>vi</b>   |
| <b>Índice de abreviaturas.....</b>  | <b>viii</b> |
| <b>Resumen.....</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>Summary.....</b>   | <b>xi</b>   |
| <b>1. Introducción.....</b>   | <b>01</b>   |
| 1.1. Progesterona y respuesta de estrés.....  | 01          |
| 1.1.1. Acciones genómicas y no genómicas.....   | 01          |
| 1.1.2. Metabolización de la progesterona hasta sus metabolitos neuroactivos.....  | 01          |
| 1.2. Estrés.....  | 02          |
| 1.2.1. Estresores.....  | 03          |
| 1.2.2. Respuesta de estrés.....   | 03          |
| 1.2.2.1. Respuesta del sistema simpático.....   | 03          |
| 1.2.2.2. Respuesta neuroendocrina.....  | 04          |
| 1.2.3. Indicadores de estrés.....   | 05          |
| 1.3. Acciones de la progesterona y de sus metabolitos neuroactivos en la reducción de la respuesta de estrés.....   | 06          |
| 1.4. Suspensión del tratamiento con progesterona y respuesta de estrés.....   | 08          |
| 1.5. Modelo experimental: ovino.....  | 09          |
| 1.5.1. Ciclo estral y ciclicidad: aspectos generales.....   | 09          |
| 1.5.1.1. Fase luteal: secreción y concentración de progesterona sérica.....   | 09          |
| 1.5.1.2. Final de la fase luteal: luteólisis y disminución de la concentración de progesterona sérica.....  | 10          |
| 1.5.1.3. Fisiología del anestro: anestro estacional, posparto y lactacional.....  | 11          |
| 1.6. Administración de progesterona: dispositivo intravaginal CIDR y concentración de progesterona sérica.....  | 11          |
| 1.7. Desafíos estresantes.....  | 13          |
| 1.7.1. Destete.....   | 13          |
| 1.7.2. Test de aislamiento social.....  | 14          |
| <b>2. Hipótesis y Objetivo Generales.....</b>   | <b>15</b>   |
| 2.1. Hipótesis general.....   | 15          |
| 2.2. Objetivo general.....  | 15          |
| <b>3. Estrategia Experimental.....</b>  | <b>16</b>   |
| 3.1. Estrategia general.....  | 16          |
| 3.2. Experimento 1.....   | 16          |
| 3.2.1. Estudio 1: Efectos del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas..... | 17          |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2. Estudio 2: Efectos del tratamiento con progesterona sobre la producción y composición de leche en ovejas.....  | 17        |
| 3.3. Experimento 2: Efectos de la suspensión del tratamiento con progesterona sobre la respuesta de estrés al test de aislamiento social en ovejas.....           | 17        |
| <b>4. Introducción, objetivos, resultados y discusión experimental.....</b>   | <b>18</b> |
| 4.1. Experimento 1: Efecto del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas ..... | 18        |
| 4.1.1. Introducción.....  | 18        |
| 4.1.2. Hipótesis específicas.....   | 19        |
| 4.1.3. Objetivos específicos.....   | 19        |
| 4.1.4. Metodología general.....   | 19        |
| 4.1.4.1. Estudio 1: Efectos del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas..... | 19        |
| 4.1.4.2. Estudio 2: Efectos del tratamiento con progesterona sobre la producción y composición de leche en ovejas .....   | 21        |
| 4.1.5. Análisis Estadístico.....  | 22        |
| 4.1.6. Resultados.....  | 22        |
| 4.1.6.1. Estudio 1.....   | 22        |
| 4.1.6.2. Estudio 2.....   | 28        |
| 4.1.7. Discusión.....   | 29        |
| 4.2. Experimento 2: suspensión del tratamiento con progesterona en borregas y respuesta de estrés al test de aislamiento social.....                              | 31        |
| 4.2.1. Introducción.....  | 31        |
| 4.2.2. Hipótesis específica.....  | 31        |
| 4.2.3. Objetivo específico.....   | 31        |
| 4.2.4. Metodología.....   | 31        |
| 4.2.5. Análisis estadístico.....  | 34        |
| 4.2.6. Resultados.....  | 34        |
| 4.2.7. Discusión.....   | 40        |
| <b>5. Discusión General.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>6. Conclusiones Generales.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>7. Bibliografía.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>8. Anexos.....</b>   | <b>57</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Metabolización de la progesterona hasta las pregnanolonas.....   | 02 |
| Figura 2. Activación del Sistema Nervioso Simpático y algunas de sus respuestas..  | 04 |
| Figura 3. Respuesta Neuroendocrina de estrés .....   | 05 |
| Figura 4. Mecanismos planteados a través de los que la P4 mitiga la respuesta de estrés.....   | 08 |
| Figura 5. Concentración sérica de progesterona en ciclo estral ovino.....  | 10 |
| Figura 6. Concentración sérica de progesterona en ovejas ovariectomizadas antes, durante y después del tratamiento con CIDR por 14 días.....   | 12 |
| Figura 7. Concentración de progesterona en siete ovejas tratadas con progesterona durante 32 días.....   | 22 |
| Figura 8. Peso corporal de corderos durante el tratamiento de sus madres con progesterona por 29 días o de madres no tratadas.....   | 23 |
| Figura 9. Frecuencia de registros en que se observó cada oveja parada, echada y caminando antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona durante 32 días y de ovejas no tratadas..... | 24 |
| Figura 10. Frecuencia de registros en que se observó cada oveja pastando y rumiando antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona durante 32 días y de ovejas no tratadas.....       | 25 |
| Figura 11. Frecuencia de registros en que se observó cada oveja costeando y vocalizando antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona durante 32 días y de ovejas no tratadas.....   | 26 |
| Figura 12. Concentraciones de proteínas séricas totales, albúmina y globulinas antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona durante 32 días y de ovejas no tratadas.....            | 27 |
| Figura 13. Producción y composición de leche en ovejas tratadas con progesterona durante 16 días y en ovejas no tratadas.....  | 28 |
| Figura 14: Representación esquemática del coral en que se realizó el test de aislamiento social.....   | 32 |
| Figura 15. Esquema de muestreo realizado: tiempos de determinación de progesterona, glucemia y cortisol en relación al test de aislamiento social.....   | 34 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 16. Perfil de concentración de progesterona sérica de las 5 borregas durante el tratamiento con progesterona y luego de la suspensión del mismo.....   | 35 |
| Figura 17. Frecuencia respiratoria en borregas antes y luego del test de aislamiento social. Diez borregas fueron tratadas con progesterona, la que fue suspendida 24 h antes del test; diez borregas no recibieron tratamiento.....              | 36 |
| Figura 18. Temperaturas del perineo; abdomen; cardíaca; y rectal antes y luego del test de aislamiento social. Se trataran 10 borregas con progesterona, la que fue suspendida 24 h antes del test; diez borregas no recibieron tratamiento.....  | 37 |
| Figura 19. Concentración de progesterona sérica en borregas antes y luego del test de aislamiento social. Diez borregas fueron tratadas con progesterona, la que fue suspendida 24 h antes del test; diez borregas no recibieron tratamiento..... | 38 |
| Figura 20. Concentración de cortisol sérico en borregas antes y luego del test de aislamiento social. Diez borregas fueron tratadas con progesterona, la que fue suspendida 24 h antes del test; diez borregas no recibieron tratamiento.....     | 39 |
| Figura 21. Glucemia en borregas antes y luego del test de aislamiento social. Diez borregas fueron tratadas con progesterona, la que fue suspendida 24 h antes del test; diez no recibieron tratamiento.....                                      | 39 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotrofina  
AVP: argenina vasopresina  
CIDR: controlled internal drug releasing  
CL: cuerpo lúteo  
CRH: hormona liberadora corticotrofina  
DHP: dihidroprogesterona  
E1E1-C: grupo control del experimento I, estudio I  
E1E1-P4: grupo tratamiento del experimento I, estudio I  
E1E2-C: grupo control del experimento I, estudio II  
E1E2-P4: grupo tratamiento del experimento I, estudio II  
E2- SP4C: grupo control del experimento II  
E2-SP4: grupo tratamiento del experimento II  
E2: estrógenos  
FC: frecuencia cardiaca  
FR: frecuencia respiratoria  
GABA<sub>A</sub>: ácido  $\gamma$ - aminobutírico<sub>A</sub>  
GnRH: hormona liberadora de gonodotrofinas  
HHA: eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal  
HSD: hidroxisteroide dihidrogenasas  
INIA: Instituto de investigación agropecuaria  
LH: hormona luteinizante  
P4: progesterona  
PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 $\alpha$   
SNAS: sistema nervioso autónomo simpático  
SNC: sistema nervioso central  
TAS: test de aislamiento social  
THP: tetrahidroprogesterone  
IST: isolation stress test

## RESUMEN

En roedores se ha demostrado que metabolitos de la progesterona (P4) con grupo 3 $\alpha$ -hydroxy reducen la respuesta de estrés o ansiedad, mientras que la suspensión de tratamientos con P4 la aumenta. En ovinos el destete abrupto puede provocar una respuesta de estrés en la madre y en la cría. Además, los ovinos son altamente gregarios, por lo que el test de aislamiento social (TAS o test de open-field) genera una marcada respuesta de estrés. Los objetivos de esta Tesis fueron determinar si el tratamiento con niveles luteales de P4 reduce la respuesta de estrés al destete, y si la suspensión del tratamiento con P4 aumenta la respuesta de estrés al TAS en ovejas. Para ello se realizaron 2 experimentos. En el primero se determinó si el tratamiento con niveles luteales de P4 reduce la respuesta de estrés al destete en ovejas en anestro. Dado que no podemos descartar un posible efecto de la P4 sobre el desarrollo de los corderos a través de posibles diferencias en la producción de leche entre los grupos, un objetivo complementario fue realizado para determinar si el tratamiento con P4 afecta la producción y composición de la leche las ovejas, y el peso de sus corderos. Se realizaron 2 estudios; en el Estudio 1, 7 ovejas fueron tratadas con dispositivos liberadores de P4 (CIDR, 0,3 g de progesterona) durante 32 días (grupo E1E1-P4), y ocho ovejas quedaron sin tratamiento (grupo E1E1-C). Se registró el peso de los corderos durante el tratamiento con P4. Se destetaron los corderos a los 59 días posparto (Día: 0), y se registraron los principales comportamientos antes y después del destete realizando registros cada 10 min. Se determinaron las proteínas totales, albúmina y globulinas séricas de las ovejas antes y después del destete. En el Estudio 2, se determinó la producción y composición de leche en dos grupos, uno de 6 ovejas tratadas con P4 durante 16 días (grupo E1E2-P4) y otro de 5 ovejas sin tratamiento (grupo E1E2-C). El peso de los corderos aumentó con el tiempo (P=0,001) de igual manera en ambos grupos. El porcentaje de observaciones en que cada oveja costeo en el Día 0 fue mayor en el grupo E1E1-C que en el grupo E1E1-P4 (P=0,0007). De manera similar, el porcentaje de observaciones en que cada oveja vocalizó en el Día 0 fue mayor en el grupo E1E1-C que en el grupo E1E1-P4 (P=0,04). El porcentaje de observaciones en que las ovejas E1E1-P4 fueron registradas echadas no cambió del Día 0 al Día 1, sin embargo aumentó en las ovejas E1E1-C. La concentración de proteínas totales no cambió en las ovejas E1E1-P4 del Día 0 al Día 3, y disminuyó en las ovejas E1E1-C (P=0,04). La concentración de globulinas fue mayor en las ovejas E1E1-P4 en el Día 3 que las ovejas E1E1-C (P=0,0008). En el Estudio 2, no hubo diferencias entre grupos en la producción y composición de leche. El objetivo del Experimento 2 fue determinar si la suspensión del tratamiento con P4 aumenta la respuesta de estrés al TAS en ovejas en anestro. Se utilizaron 20 borregas, 10 tratadas con CIDRs durante 13 días (grupo E2-SP4), y las otras 10 sin tratamiento (grupo E2- SP4C). El grupo E2-SP4C fue sometido al TAS a las 24 h del retiro de los CIDRs. Las borregas fueron aisladas individualmente durante 10 minutos en un área novedosa, y se registraron las actividades de los animales mediante dos cámaras de video. Se obtuvieron muestras de sangre por venopunción yugular antes y después del TAS, y se determinó la concentración de cortisol, la glucemia y la concentración de P4. Se registraron las frecuencias cardíaca (FC) y respiratoria (FR), y las temperaturas superficiales y rectal. A partir de los videos, se registraron los comportamientos durante el TAS. Las borregas E2-SP4 tendieron a aumentar más la concentración de cortisol al TAS que las borregas E2- SP4C (P= 0,07), y a tener una mayor área bajo la curva que las

borregas E2- SP4C (P= 0,08). No hubo diferencias entre los grupos en la variación de la glucemia y P4, ni en la FC, FR, temperaturas y comportamientos registrados. En conclusión, el tratamiento con P4 redujo la respuesta de estrés al destete en ovejas en anestro, y encontramos indicios de que la disminución de la concentración de P4 genera una mayor respuesta de estrés al TAS en borregas en anestro.



## SUMMARY

Has been reported in rodents that the metabolites containing 3 $\alpha$ -hydroxyl group generated by progesterone (P4) treatments, may reduce the stress response and anxiety, while P4 withdrawal may increase these responses. Abrupt weaning may provoke a stress response in the ewe and the lamb. On the other hand, sheep are gregarious thus isolation from the flock provokes a stress response. The aim of the Thesis was to determine if administration of luteal levels of P4 reduces the stress response of ewes to abrupt weaning of the lambs, and P4 withdrawal increases the stress response to isolation in hogget. Thus, we performed 2 experiments. In Experiment 1 the aim was to determine if P4 administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of the lambs. However, we could not discard a possible effect of P4 on lamb development through ewes' milk production, so our complementary aim was to determine if P4 treatment affects milk yield and composition of ewes, and the body weight of their lambs. In Experiment 1, we performed two trials, in Trial 1, seven ewes received a P4 treatment during 32 days (group E1E1-P4), and eight ewes remained as an untreated control (group E1E1-C). Body weight of the lambs was recorded during P4 treatment. Lambs were weaned at 59 days (Day: 0). The main behaviours of the ewes before and after weaning were recorded using 10 min scan sampling. The ewes' serum total protein, albumin and globulin concentrations were measured before and after weaning the lambs. In Trial 2, milk yield and composition were determined in two different groups of six ewes treated with P4 (group E1E2-P4) during 16 days and five untreated controls (group E1E2-C). Body weight of lambs increased with time ( $P=0.001$ ) in both groups, and did not differ. The percentage of observations in which the ewes were observed pacing on Day 0 was greater in E1E1-C group than E1E1-P4 group ( $P=0.0007$ ). Similarly, the percentage of observations in which the ewes were recorded vocalizing on Day 0 was greater in E1E1-C group than E1E1-P4 group ( $P=0.04$ ). The percentage of observations in which E1E1-C ewes were recorded lying did not change from Day 0 to Day 1, however it increased in E1E1-P4 ewes. Total serum protein concentration did not change in E1E1-P4 ewes from Day 0 to Day 3, and there was a decrease in E1E1-C ewes ( $P=0.04$ ). Serum globulin concentration was greater in E1E1-P4 ewes on Day 3 than E1E1-C ewes ( $P=0.0008$ ). In Trial 2, there were no differences between groups in milk yield and composition. In Experiment 2, the aim was to determine if P4 withdrawal increases the stress response to isolation in anestrus ewes. We used 20 hogget, being 10 were treated with CIDRs (group E2-P4) during 13 days (group E2-SP4), and 10 hogget remained as an untreated control (group E2-SP4C). The E2-SP4 group was submitted to isolation stress test (IST) 24 h after P4 withdrawal. The hogget were individually isolated in a novel place during 10 min. We recorded the activities of the animals by two cameras. Hogget were bled via jugular venipuncture before and after IST, and we measured cortisol, glycaemia, and P4 concentration. We recorded heart rate (HR), respiration rate (RR), and superficial and rectal temperature. From the videos we recorded the behaviours during IST. The E2-SP4 hogget tended to present greater variation in cortisol concentration after isolation stress than E2-SP4C hoggets ( $P=0.07$ ), and to present greater area under curve than E2-SP4C hoggets ( $P=0.08$ ). There were no differences between groups in the glycaemia and P4 concentration, HR, RR, temperatures and behaviours recorded. In conclusion, P4 administration reduces the stress response of ewe to abrupt weaning of the lambs, and we found

evidence that P4 withdrawal increase stress response to isolation in anestrous hoggets.

Hasta el momento esta Tesis ha generado un artículo científico:

Freitas-de-Melo A, Banchero G, Hötzel MJ, Damián JP, Ungerfeld R. Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of the lambs. Aceptado el 11 de marzo de 2013 en *Animal*. (Anexo 1).

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Progesterona y respuesta de estrés**

En roedores se ha demostrado que metabolitos de la progesterona (P4) con grupo  $3\alpha$ -hydroxy, llamados de metabolitos neuroactivos (allopregnanolona y pregnanolona), reducen la respuesta de estrés o ansiedad, mientras que la suspensión de tratamientos con P4 la aumenta. La mayoría de los trabajos que determinaron los efectos del tratamiento con P4 (revisión: Barbaccia et al. 1998; ratones: Reddy et al. 2005; Ducharme et al. 2010; ratas: Heinsbroek et al. 1988; Bitran et al. 1993; Gomez et al. 2002) o de la suspensión del mismo (ratas: Gallo & Smith, 1993; Löfgren et al. 2006; 2009; meriones: Starkey & Bridges, 2010) sobre la respuesta de estrés o ansiedad, fueron realizados en roedores, no existiendo hasta la fecha trabajos en rumiantes que lo hayan estudiado *in vivo*. Si bien Viérin & Bouissou (2001) determinaron que las ovejas gestantes, caracterizadas por presentar altas concentraciones de P4, tienen menor respuesta de estrés al test de aislamiento social (TAS) que las ovejas vacías, los resultados no permitieron adjudicarle dicho efecto a la P4. Orihuela et al. (2002) no encontraron diferencia en la respuesta del estrés del transporte entre ovejas en diestro y ovejas proestro, aunque en este caso tampoco se aísla el efecto de la P4. Por último, Magri et al. (2013) determinó el efecto de un tratamiento con P4 y de la suspensión del mismo sobre la reactividad del animal, pero no evaluaron la respuesta de estrés. Por lo tanto, los mecanismos por los cuales la P4 o sus metabolitos reducen la respuesta de estrés continúan bajo estudio.

### **1.1.1. Acciones genómicas y no genómicas**

Las P4 actúa vía mecanismos genómicos a partir de la unión a receptores intracelulares induciendo cambios en la expresión de los genes, lo que estimula o inhibe la transcripción génica y la síntesis de proteínas, y genera la respuesta celular (Schumacher et al. 1999); este mecanismo es de respuesta lenta, pudiendo demorar desde minutos hasta días (McEwen, 1991; Rupprecht et al. 1996; Lösel et al. 2003). En contraste, la P4 y sus metabolitos neuroactivos actúan de forma no genómica a partir de la unión a receptores ionotrópicos en el sistema nervioso central (SNC), estos receptores son miembros de la superfamilia de canales iónicos que regulan la neurotransmisión rápida; promoviendo cambios inmediatos en el orden de los milisegundos a segundos (Lambert et al. 2009; King, 2012). Por lo tanto, la P4 puede actuar en la reducción de la respuesta de estrés tanto a través de mecanismos genómicos como no genómicos.

### **1.1.2. Metabolización de la progesterona hasta sus metabolitos neuroactivos**

Los principales mecanismos determinados por los cuales la P4 reduce la respuesta de estrés, o la disminución brusca de P4 genera efectos ansiogénicos son explicados a partir de los metabolitos neuroactivos de la P4. Por ello, es importante describir de manera sucinta el proceso de metabolización de la P4 hasta estos metabolitos neuroactivos, porque influyen en la respuesta de estrés.

La metabolización de la P4 hasta sus metabolitos neuroactivos se lleva a cabo en dos tipos de reacciones (Figura 1): (I) reducción del anillo A, a través de las

enzimas  $5\alpha$  y  $\beta$  reductasas, generando como productos  $5\alpha$  o  $5\beta$  pregnanediona [también llamadas de  $5\alpha$  o  $5\beta$  dihidroprogesterona (DHP)]; (II) los productos de la primera reacción son reducidos reversiblemente por la  $3\alpha$  y  $3\beta$ -hidroxiesteroide dihidrogenasas ( $3\alpha$  y  $3\beta$  HSD), formando los isómeros pregnanolonas (Wood & Gower, 2010), siendo los neuroactivos aquellos con grupo  $3\alpha$ -hydroxy, la allopregnanolona y pregnanolona. La metabolización de la P4 hasta sus metabolitos neuroactivos ocurre principalmente en el hígado (Pluchino et al, 2009), pero también puede ocurrir en los riñones, en los pulmones (Piccinato, 2008) y en el cerebro (Compagnone & Mellon, 2000).

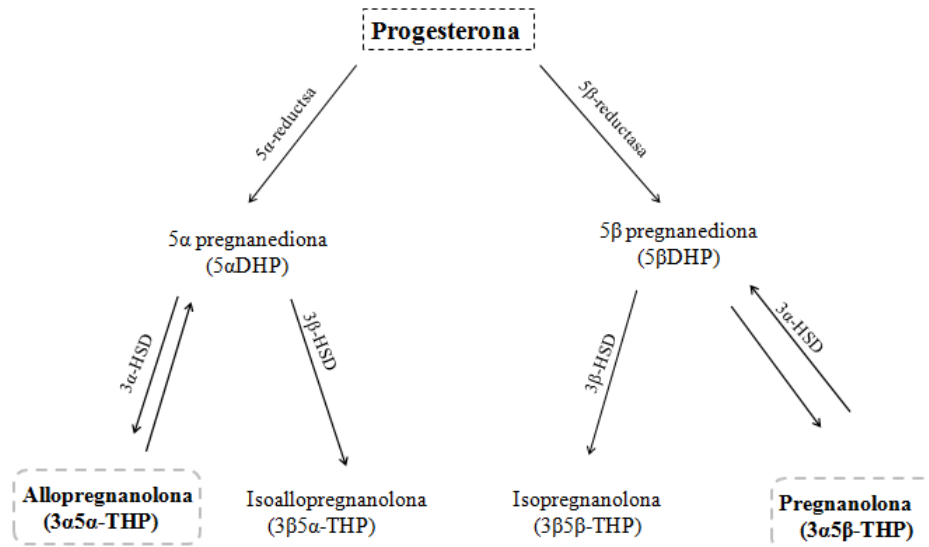


Figura 1. Metabolización de la progesterona hasta las pregnanolonas (Adaptado de Compagnone & Mellon, 2000). Flechas simples y dobles representan reacciones irreversibles y reversibles respectivamente. DHP: dihidroprogesterona; HSD: hidroxiesteroide dihidrogenasas; THP: tetrahidroprogesterone.

## 1.2. Estrés

El primero en introducir el concepto de estrés en la literatura científica fue Selye, definiendo el estrés como una respuesta no específica del organismo a un estímulo dañino (Pacák et al. 1998; Koolhaas et al. 2011). Por otro lado, Cannon (1929) definió como homeostasis los procesos fisiológicos coordinados que mantienen constante el estado del organismo. A diferencia de Selye, Cannon nunca utilizó el término estrés, y destacó que las respuestas que se desencadenan para mantener la homeostasis sirven para que el animal responda a través del sistema de emergencia de "lucha o huida" (Pacák & Palkovits, 2001). En este sentido, Sapolsky (2004) define estrés como "un estado de desbalance homeostático".

Por otro lado, el estrés también involucra aspectos cognitivos y perceptivos. Weiss (1972) planteó que las respuestas del organismo a los estímulos que desequilibran la homeostasis varían de acuerdo al grado en que estos estímulos puedan ser predichos y controlados. Busch & Hayward (2009) afirman que el estrés es dependiente de la percepción individual, y que permite focalizar la energía para enfrentarse a un estímulo de corto plazo que desequilibra la homeostasis. Por otro lado, si este estímulo es de largo plazo reduce la inversión en cortejo, defensa

territorial, reproducción, crecimiento y/o en el sistema inmune. En este contexto general, el estrés considera aspectos perceptivos y cognitivos en asociación a las respuestas fisiológicas y comportamentales (Koolhaas et al. 2011) a la hora de responder a estímulos que amenazan a la homeostasis.

### **1.2.1. Estresores**

El termino estresor es un neologismo de Selye (1974) para definir el agente capaz de desencadenar la respuesta de estrés. Un estresor puede ser clasificado de acuerdo a su naturaleza en cuatro categorías: 1) físicos (por ejemplo, frío, calor, radiación intensa, ruido y vibración); 2) psicológicos (afectan el proceso emocional, resultando en ansiedad, miedo o frustración); 3) sociales (por ejemplo, agresión y dominancia, aislamiento del grupo e interacción aversiva con el humano); y 4) metabólicos (por ejemplo, ejercicio físico, hemorragia, hipoglucemia) (Pacák & Palkovits, 2001). Además, los estresores pueden variar en intensidad y tiempo de duración, pudiendo ser agudos (exposición de corta duración) o crónicos (exposición prolongada en el tiempo) (Pacák & Palkovits, 2001). El tipo de estresor condiciona la magnitud y/o tipo de respuesta de estrés (aguda o crónica) (Griffen, 1989), por lo que es relevante identificar el estresor cuando se estudia la respuesta de estrés.

### **1.2.2. Respuesta de estrés**

Cuando un individuo percibe un estresor ocurre la activación simultánea de dos respuestas: la del sistema nervioso autónomo simpático (SNAS), y la neuroendocrina. La del sistema simpático es la más rápida, o sea, la que produce efectos casi inmediatamente (en segundos a minutos) de expuesto al estresor. Sin embargo, en comparación con la respuesta del SNAS, la respuesta neuroendocrina presenta efectos más sostenidos en el tiempo (minutos a horas), y juntas producen cambios fisiológicos y comportamentales (Johnson et al. 1992) que ayudan al organismo a adaptarse y responder al estresor. La magnitud de estas respuestas puede depender de factores como raza, edad, sexo (Griffin, 1989), balance energético, experiencia previa, temperamento y percepción del estresor por parte del individuo (McEwen & Wingfield, 2003; Early et al. 2010).

#### **1.2.2.1. Respuesta del sistema simpático**

A partir de una acción nerviosa directa, cuando el SNAS es estimulado se liberan los neurotransmisores adrenalina y noradrenalina en el espacio sináptico de neuronas pos-ganglionares, también llamadas de sinapsis adrenérgicas. La adrenalina y noradrenalina se unen a los tipos de receptores pos-sinápticos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\alpha$  estimulando o inhibiendo la actividad de los órganos en los que se expresan. La adrenalina y noradrenalina, también llamadas de catecolaminas, son liberadas al torrente sanguíneo a partir de las neuronas pos-ganglionares presentes en la medula adrenal de las glándulas adrenales. La circulación de las catecolaminas en el torrente sanguíneo complementa la acción nerviosa directa, actuando de manera más amplia y prolongada en los órganos blancos. De manera general, los efectos generados por las catecolaminas son: aumento de la frecuencia cardiaca (FC) y respiratoria (FR), de la temperatura y de la glucogenólisis, midriasis, vasodilatación de la musculatura esquelética y vasoconstricción periférica (Moberg, 2000; White & Porth, 2000; Cunningham, 2008) (Figura 2). También, se producen cambios comportamentales a través de la activación de zonas del SNC como el hipocampo, la amígdala y el

hipotálamo, lo que aumenta el estado de alerta, vigilancia y excitación, e inhibe zonas cognitivas del cortex (Sabban, 2010). Todos estos cambios contribuyen para que el animal pueda responder a través del sistema de emergencia de "lucha o huida" propuesto por Cannon (Pacák & Palkovits, 2001).

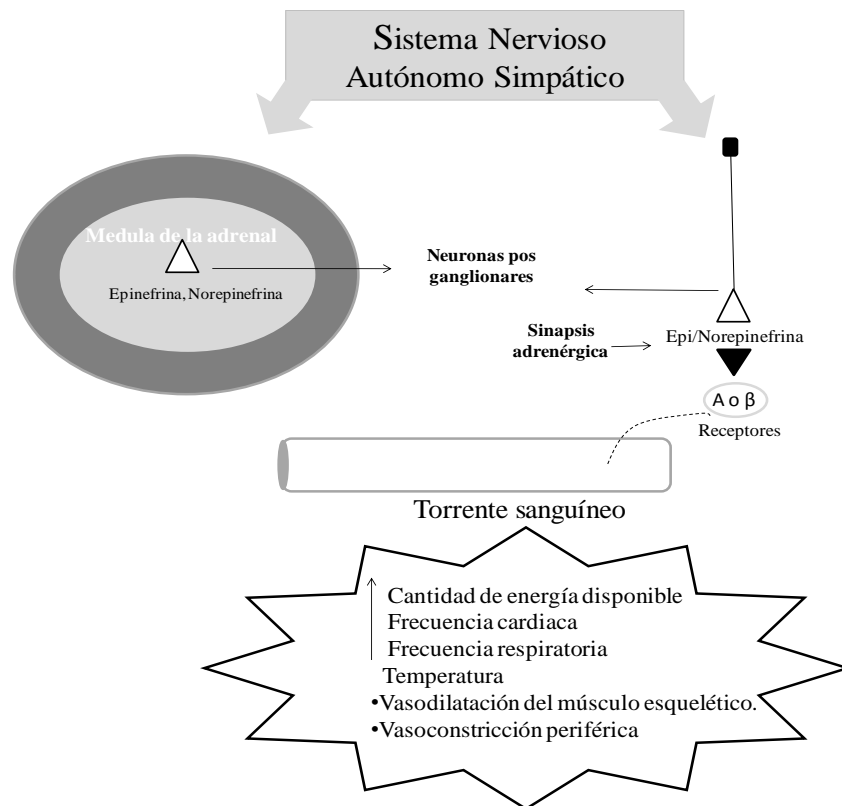


Figura 2. Activación del sistema nervioso autónomo simpático y algunas de sus respuestas (adaptado de Cunningham, 2008).

### 1.2.2.2. Respuesta neuroendocrina

La respuesta neuroendocrina comienza con la activación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA): el hipotálamo libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y argenina vasopresina (AVP), las que estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) por parte de la adenohipófisis (Matteri et al. 2000). La ACTH llega por el torrente sanguíneo a la glándula adrenal, se une a receptores localizados en la corteza, donde estimula la secreción y liberación de glucocorticoides, siendo los principales el cortisol y la corticosterona (Johnson et al. 1992; Engelmann et al. 2004) (Figura 3). Los glucocorticoides estimulan la gluconeogénesis, la lipólisis y el catabolismo de las proteínas, elevando la glucemia y proporcionando energía para que el organismo pueda responder al estresor (Kudielka & Kirschbaum, 2007). Además, los glucocorticoides aumentan la perfusión cerebral, la utilización de glucosa, la presión arterial y el rendimiento cardíaco (Sapolsky et al. 2000). Los glucocorticoides también pueden provocar linfopenia y neutrofilia, y un cambio neto de leucofilia (Griffen, 1989), generando una mayor susceptibilidad a enfermedades a partir de la reducción de la inmunidad humoral (Griffen, 1989). Los glucocorticoides promueven cambios comportamentales como la reducción de la expresión del comportamiento sexual, así

como del apetito (Sapolsk et al. 2000; Maniam & Morris, 2012). Todos estos cambios fisiológicos y comportamentales finalizan con la inactivación del eje HHA a través de una retroalimentación negativa, donde los glucocorticoides inhiben la secreción de CRH, AVP y ACTH (Matteri et al. 2000).

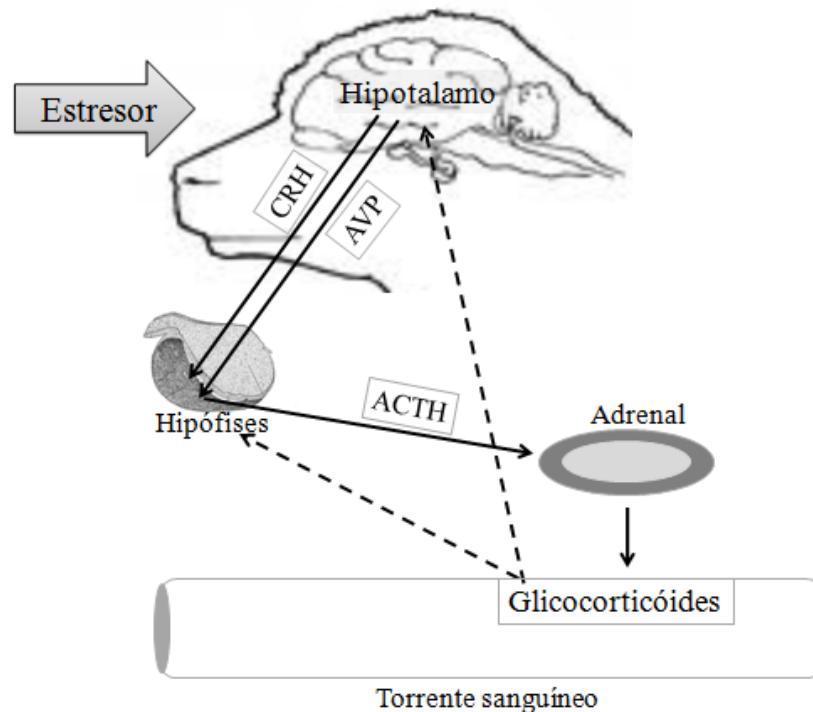


Figura 3. Respuesta Neuroendocrina de estrés. ACTH: hormona adrenocorticotrófica; AVP: argenina vasopresina; CRH: hormona liberadora corticotropina. Flechas continuas: estimulación; flechas discontinuas: inhibición (Adaptado de Matteri et al. 2000).

### 1.2.3. Indicadores de estrés

Dado que la respuesta de estrés genera cambios fisiológicos y comportamentales, es posible utilizar estos cambios como indicadores para determinar la presencia o la magnitud de la respuesta de estrés. En ovinos, se ha utilizado ampliamente el incremento en la concentración de cortisol como indicador de la activación de la respuesta neuroendocrina de estrés. Por ejemplo, se reportó que existe un aumento de la concentración de cortisol en ovejas luego del destete (Pérez-León et al. 2006) o en carneros luego del aislamiento social (Parrott et al. 1987). La concentración de glucosa en sangre también se ha utilizado como indicador de estrés, observándose un aumento de la glucemia en ovejas luego del TAS (Al-Qarawi & Badreldin, 2005). En ovinos, el aumento en la FC (Von Borrel et al. 2007), FR y temperatura también son usados para determinar la magnitud o presencia de la respuesta de estrés. Por ejemplo en ovejas ocurre un aumento de la FC y de la temperatura después del TAS (da Costa et al. 2004; Pedernera-Romano et al. 2010), y en carneros se produce un aumento de la FR durante la electroeyaculación (Damián y Ungerfeld, 2011). A su vez, los cambios en la concentración de proteínas séricas, como proteínas totales, albúmina y globulinas, son considerados indicadores de estrés en rumiantes. Por ejemplo, luego del TAS y restricción de movimiento ocurre una disminución en la concentración de proteínas totales en corderos (Apple et al.



1993). También en novillos y toros luego del transporte se observa un aumento de las proteínas totales, albúmina y globulinas (Galyean et al. 1981; Early et al. 2011); y en vacas luego del destete aumenta la concentración de proteínas totales y disminuyen las de albúmina (Ungerfeld et al. 2011). Además, los cambios en el comportamiento como el aumento de movimientos, vocalizaciones, micción y defecación y la reducción del consumo de alimento y rumia (Romeyer & Bouissou, 1992; Bouissou & Vandenheede, 1995; Cockram et al. 1993) son frecuentemente usados como indicadores de estrés en ovinos. También, se ha visto que el transporte provoca un aumento en la concentración sérica de P4 en ovejas en anestro (Dobson et al. 1999). En síntesis, utilizar diferentes tipos de indicadores de estrés (Bath, 1998; Möstl & Palme, 2002) es conveniente, ya que la respuesta de estrés varía de acuerdo a la especie y tipo de estresor aplicado.

### **1.3. Acciones de la progesterona y de sus metabolitos neuroactivos en la reducción de la respuesta de estrés**

La P4 atraviesa fácilmente la barrera hematocefálica pudiendo alterar la excitabilidad neuronal en el SNC al antagonizar receptores de neurotransmisores serotoninérgicos e inhibir receptores nicotínicos (Valera et al. 1992; Wu et al. 2000), además de presentar una baja afinidad a los receptores neuronales inhibitorios GABA<sub>A</sub> y glicina (Wu et al. 1990). En este sentido, la P4 promueve efectos inhibitorios o reduce efectos excitatorios en el SNC. Adicionalmente, a partir de la P4 se generan metabolitos en sangre, entre ellos la DHP y pregnanonas (ovejas: Seamark, 1969; ratas: Corpechot et al. 1993), que también atraviesan la barrera hematoencefálica (Pluchino et al. 2009). La P4 y/o la DHP también pueden ser metabolizadas en el cerebro hasta allopregnanolona y pregnanona (Compagnone & Mellon, 2000). De esa manera, los metabolitos neuroactivos de la P4 alcanzan concentraciones elevadas en el cerebro (ratas: Purdy et al. 1991; Paul & Purdy, 1992). Una vez en el SNC, la allopregnanolona y la pregnanona también pueden unirse a receptores de neurotransmisores, estimulando receptores de neurotransmisores inhibitorios, como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>) y la glicina, o inhibiendo receptores de neurotransmisores excitatorios, como de la nicotina, la serotonina y el N-metil-D-aspartato (Bullock et al. 1997; Jiang et al. 2006; Kaura et al. 2007; Sedláček et al. 2008). Por lo tanto, la allopregnanolona y la pregnanona pueden reducir la excitabilidad neuronal en el SNC a partir de la interacción con receptores de neurotransmisores. En este sentido, la afinidad y efectos de los metabolitos de la P4 sobre el receptor GABA<sub>A</sub> fueron los más estudiados entre los receptores mencionados (Wang, 2011). La allopregnanolona y pregnanona presentan alta afinidad por el receptor GABA<sub>A</sub>, receptor inhibitorio encontrado en la mayoría de las neuronas del SNC de los mamíferos (Olsen & Tobin, 1990), modulando positivamente de manera alostérica el mismo (Lambert et al. 2009). Esta acción modula preferencialmente la apertura de canales de Cl<sup>-</sup>, lo que resulta en una hiperpolarización de la célula, pudiendo generar efectos ansiolítico, sedativo y/o analgésico (Akk et al. 2007). En síntesis, la P4 podría reducir la respuesta de estrés, disminuyendo la percepción del estresor a través de un efecto ansiolítico.

La acción clásica de la P4 sobre receptores intracelulares podría estar relacionada a efectos en la reducción de la respuesta de estrés, pero este mecanismo todavía no está bien establecido en la literatura. Algunas evidencias utilizando ratones *knock-out* para receptores intracelulares P4 indican que la reducción de la

respuesta de estrés o de la ansiedad podría no requerir una acción directa de la P4 sobre los receptores P4 aunque en dichos animales se observó una mayor sensibilidad a la P4 (Reddy et al. 2005). Además, Bitran et al. (1995) utilizando ratas pre-tratadas con antagonista del receptor de P4, no encontraron afectados los efectos de la P4 en la reducción de la respuesta de estrés. Sin embargo, otros estudios realizados en ratas plantean la existencia de este efecto directo de la P4 o de la DHP sobre los receptores de P4 (Auger & Forbes-Lorman, 2008; Miryala et al. 2011; Hassell et al. 2011; Uphouse et al. 2013; Uphouse & Hiegel, 2013), ya que los metabolitos neuroactivos de la P4 no se unen a los receptores de P4 (Smith et al. 1974). En este sentido, la P4 podría estar actuando sobre sus receptores intracelulares en el cerebro, ya que los mismos se encuentran expresados en zonas del cerebro como la amígdala y los núcleos del lecho de la estría terminal (Brinton et al. 2008), áreas relacionadas con la respuesta de estrés, miedo o ansiedad (Walker et al. 2003). Por lo tanto, la P4 o la DHP podrían actuar directamente en estos receptores intracelulares reduciendo la respuesta de estrés. Sin embargo, hay que considerar que en algunos de estos trabajos que especulan con la existencia de una acción directa de la P4 o DHP, utilizaron como indicador de estrés la frecuencia de lordosis (Miryala et al. 2011; Hassell et al. 2011; Uphouse et al. 2013; Uphouse & Hiegel, 2013), comportamiento indicativo de receptividad sexual. En este sentido, es necesario considerar que los receptores de P4 están fuertemente involucrados en la manifestación de comportamientos sexuales (Blaustein, 2008).

Por otro lado, la P4 también podría reducir la respuesta de estrés vía unión a los receptores de glucocorticoides, ya que presenta afinidad por los mismos (Zhang et al. 2007), impidiendo o reduciendo la acción de la corticosterona y/o del cortisol.

En estudios *in vitro* utilizando tejido provenientes del SNC ovino se ha observado que los metabolitos neuroactivos de la P4 poseen alta afinidad por el receptor GABA<sub>A</sub> (Crossley et al. 2000; 2003) lo que sugiere un posible mecanismo de acción por el que la P4 genera los efectos ansiolíticos en ovinos. Más aún, en ratas machos se determinó que la allopregnanolona reduce la expresión de RNAm de CRH y AVP, de ACTH y glucocorticoides (Patchev et al. 1994; 1996; Brunton et al. 2009) y consecuentemente la respuesta comportamental indicadora de estrés (Bitran et al. 1995). A su vez, la AVP tiene acción en el area septal del cerebro, zona relacionada con la manifestación de la ansiedad (Caldwell et al. 2008), y dado que la P4 reduce la expresión de RNAm de AVP podría resultar en una disminución del despliegue de comportamientos relacionados con la ansiedad. Por lo tanto, los efectos generales de estos metabolitos de la P4 son la reducción de la respuesta neuroendocrina y comportamental indicadoras de estrés.

En la Figura 4 se propone un posible modelo para explicar los mecanismos por los que la P4 mitiga la respuesta de estrés

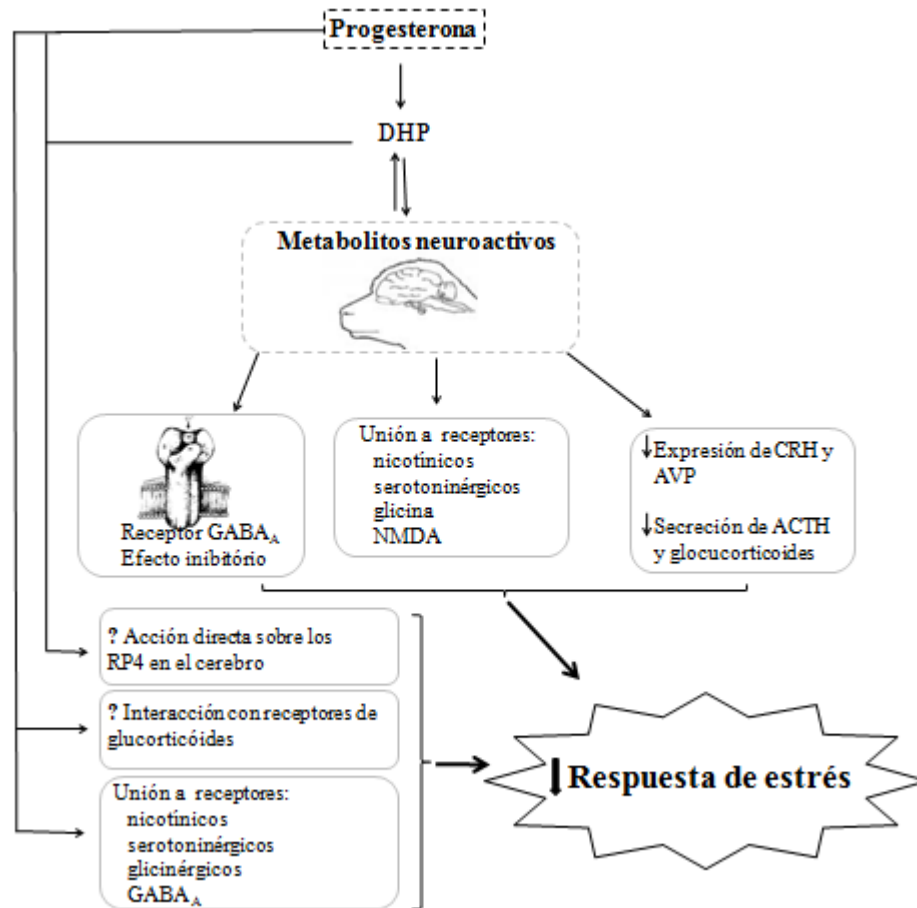


Figura 4. Mecanismos planteados a través de los que la P4 mitiga la respuesta de estrés. ACTH: hormona adrenocorticotrófica; AVP: argenina vasopresina; CRH: hormona liberadora corticotropina; DHP: dihidroprogesterona; GABA<sub>A</sub>: ácido  $\gamma$ -aminobutírico<sub>A</sub>; RP4: receptor de progesterona.

#### 1.4. Suspensión del tratamiento con progesterona y respuesta de estrés

Durante el síndrome premenstrual de las mujeres se manifiestan comportamientos relacionados con la ansiedad, por lo que se han realizado trabajos tomando como modelo a los roedores para estudiar los efectos de la disminución brusca de la P4 (Smith et al. 2007). En este modelo, la aparición de ansiedad frecuentemente es explicada en función de cambios en los niveles de metabolitos neuroactivos de la P4. La suspensión brusca de los tratamientos crónicos de estos metabolitos (o vía tratamiento con P4), así como la de otros compuestos capaces de activar alostéricamente el receptor GABA<sub>A</sub> (benzodiazepínicos, barbitúricos y etanol), se asocian con la aparición de manifestaciones de ansiedad y en casos extremos, con convulsiones (McCaslin & Morgan, 1988; Buck et al. 1991). En este modelo antes mencionado, se utiliza la P4 en lugar de sus metabolitos ya que la P4 atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y puede ser metabolizada en el cerebro hasta la producción de sus metabolitos neuroactivos (Karavolas & Hodges, 1991; Compagnone & Mellon, 2000). Por lo tanto, es relativamente más fácil lograr la disminución de la concentración de los metabolitos neuroactivos de la P4 en el cerebro a partir de la suspensión de un tratamiento con P4 que la del tratamiento directo con sus metabolitos neuroactivos.

Se ha demostrado que el tratamiento crónico con P4 seguido de la suspensión del mismo genera un aumento en la expresión de subunidades  $\alpha 4$  y  $\delta$  del receptor GABA (Sundstrom-Poromaa et al. 2002; Smith et al. 1998), lo que provoca una reducción neta de la potencialidad inhibitoria del GABA<sub>A</sub> en el SNC (Smith et al. 2007). En este sentido, el animal queda más susceptible a estímulos del medio (estresores) y por consiguiente la respuesta de estrés podría desencadenarse más fácilmente o con mayor intensidad.

## **1.5. Modelo experimental: ovino**

Dado que en esta tesis se utiliza como modelo experimental el ovino es necesario revisar algunos aspectos básicos de su fisiología reproductiva, centrándose sobre aquellos vinculados a la secreción de P4.

### **1.5.1. Ciclo estral y ciclicidad: aspectos generales**

Las ovejas de razas originarias de zonas de latitudes altas son poliéstricas estacionales. En general, la estación reproductiva es durante el otoño e invierno y el período de anestro (ausencia de ciclicidad) estacional durante primavera y verano (Rawlings & Bartlewski, 2007), aunque el período exacto y la duración del anestro varían de acuerdo a la raza y del lugar donde fue seleccionada. Generalmente ocurre un período de anestro durante el posparto temprano y en el periodo de lactación (Arroyo et al. 2009). Durante la estación reproductiva las ovejas presentan el ciclo estral con un intervalo entre estros de 14 a 19 días, pudiendo variar de acuerdo a la raza y la edad (Goodman & Inskeep, 2006).

El ciclo estral puede ser dividido en dos fases, la folicular y la luteal. La fase folicular tiene una duración aproximada de 4 días, y se caracteriza por el hecho de que la concentración sérica de estrógenos (E2) predomina sobre la de P4; la fase luteal (de duración media de 12 días) tiene un predominio sérico de la P4 sobre los E2 (Senger, 1999). Se considera como día 0 del ciclo estral el comienzo de la manifestación del celo, momento en que las concentraciones de P4 son basales y las de E2 son máximas. Las altas concentraciones de E2 estimulan la secreción de hormona luteinizante (LH), produciendo un aumento muy marcado de esta que finaliza con la ovulación (Goodman & Inskeep, 2006).

#### **1.5.1.1. Fase luteal: secreción y concentración de progesterona sérica**

Luego de la ovulación, a partir de los restos del folículo que ovuló se producen una serie de cambios estructurales y funcionales que conducen a la formación de un CL funcional, capaz de producir y secretar P4. Estos cambios son inducidos principalmente por la LH, citoquinas, factores angiogénicos y vasoactivos (Skarzynski et al. 2008). Se produce una reorganización de la composición celular en la que las células de la teca pasan a ser células luteales pequeñas, y las células de la granulosa pasan a ser células luteales grandes, tipos de celulares capaces de producir y secretar grandes cantidades de P4 (Smith et al. 1994). En estas células se produce una neovascularización y un cambio en la expresión de enzimas y receptores, que posibilitan el aumento en la transformación de colesterol a P4, y disminución del pasaje de P4 a E2 (Smith et al. 1994; Niswender et al. 2000; Stocco et al. 2007).

El patrón general de secreción de P4 es bastante similar entre razas ovinas, aunque puede variar de acuerdo al momento de la estación reproductiva (Wheeler & Land, 1977). Las células del CL secretan P4 en concentraciones basales en los primeros días del ciclo estral, y estas concentraciones aumentan gradualmente entre los días 3 y 11, cuando alcanza el valor máximo (Figura 5) (Bartlewski et al. 1999).

#### 1.5.1.2. Final de la fase luteal: luteólisis y disminución de la concentración de progesterona sérica

La luteólisis se caracteriza por la pérdida de la capacidad de sintetizar y secretar P4 (luteólisis funcional) y cambios en el tejido que compone el CL (luteólisis estructural) (Juengel et al. 1993; Meidan et al. 1999). En ovejas, la luteólisis comienza entre el día 12 o 13 del ciclo estral, y se completa alrededor del día 14. Durante la luteólisis hay una disminución progresiva de la concentración sérica de P4, hasta llegar a niveles basales hacia el fin del ciclo estral (Figura 5).

La prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) es una hormona liberada por el endometrio al final de la fase luteal (Stouffer, 2006) que produce la luteólisis mediante el aumento en la cantidad de algunos factores locales en el CL, como óxido nítrico, citoquinas y endotelina-1 (Skarzynski et al. 2008). Durante la fase luteal, la P4 genera una reducción en la expresión de los receptores de P4, de E2 y de oxitocina en el endometrio (Hunter, 1991). En la fase luteal tardía, dada la reducción en la cantidad de los receptores de P4 durante la fase luteal, hay una disminución del efecto negativo de la P4 sobre la síntesis de los receptores de P4, y de los receptores de E2 y oxitocina. Además, durante la fase luteal, la P4 estimula la síntesis de fosfolípidos en el endometrio, los que son la principal fuente de ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas (Eggleston et al. 1990). Alrededor del día 12 del ciclo crece una onda de desarrollo folicular, con lo que ocurre un aumento de las concentraciones séricas de E2, estimulando la producción de receptores de oxitocina en el endometrio. En este contexto, la oxitocina de origen neurohipofisario se une a sus receptores en el endometrio, estimulando la producción de PGF2 $\alpha$ . La PGF2 $\alpha$  llega al CL a través de la arteria ovárica, y estimula la secreción de oxitocina luteal, y ésta estimula un aumento de la síntesis de PGF2 $\alpha$  por el endometrio. Como a su vez la PGF2 $\alpha$  induce la luteólisis, este proceso de retroalimentación positiva finaliza con la lisis total del CL (McCracken et al. 1999).

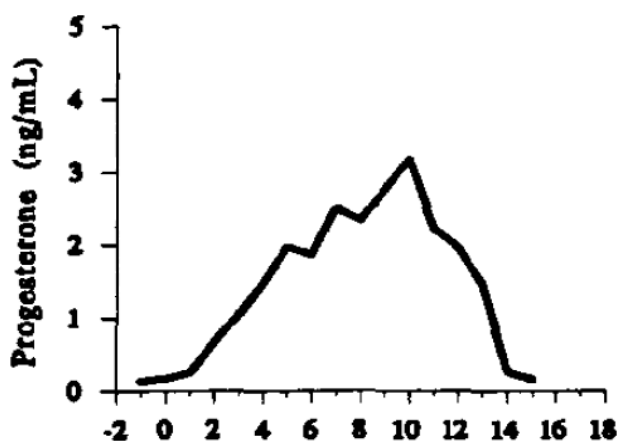


Figura 5. Concentración sérica de progesterona en ciclo estral ovino (Tomado de Bartlewski et al.1999).

### **1.5.1.3. Fisiología del anestro: anestro estacional, posparto y lactacional**

El período en el que no hay actividad cíclica es conocido como anestro (Rosa & Bryant, 2003). En ovejas, el anestro estacional es determinado fundamentalmente por influencia del fotoperíodo: la disminución de la cantidad de horas diarias de luz determina el final del anestro y por tanto el comienzo de la ciclicidad (Legan & Winans, 1981). Los efectos del fotoperíodo están mediados por la melatonina, hormona secretada por la glándula pineal durante las horas de oscuridad (Malpaux, 2006). Por tanto, el aumento o la disminución en la cantidad de horas en que se secreta esta hormona es la forma de vincular los cambios fotoperiódicos con los cambios fisiológicos. Al aumentar la cantidad de horas de luz se reduce la cantidad de horas en que se secreta melatonina, provocando que la respuesta a los E2 del eje hipotálamo-hipofisario pase a ser negativa. Este proceso hace que disminuya la frecuencia de pulsos de LH, evitando que se desencadene el pico de LH y la ovulación (Legan & Karsch, 1980). Por esto, durante el período de anestro hay una baja pulsatilidad de LH, que determina aumentos pequeños y esporádicos en la secreción de E2 (Martin, 1984). Si bien en el ovario continúa habiendo ondas de desarrollo folicular, el tamaño máximo alcanzado por los folículos dominantes y la duración de la onda es menor que en una oveja ciclando (Bartlewski et al. 1998).

Además del anestro estacional, hay un periodo de anestro en el posparto temprano, tiempo correspondiente al retorno del funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario materno, que estuvo bloqueado durante la gestación por acción de la P4 que determinó una baja pulsatilidad de LH durante este periodo (Rubianes & Ungerfeld, 2002).

Además, de acuerdo a Schirar et al. (1990), el amamantamiento inhibe la frecuencia de secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), y por tanto de LH, lo que determina el anestro lactacional. Se demostró en ovejas que experimentalmente paren en otoño, que las ovejas que siguen amamantando presentan un anestro más prolongado que las ovejas destetadas (Schirar et al. 1989; Mandiki et al. 1989), demostrando que la lactación *per se* inhibe la ciclicidad. En condiciones naturales, las ovejas originarias de latitudes altas paren en primavera, por lo que los anestros estacional, posparto y lactacional se superponen (Arroyo et al. 2009).

En resumen, los diferentes tipos de anestros mencionados a partir de diferentes mecanismos impiden que se produzca un pico de LH y por consiguiente la ovulación y formación de un CL funcional. En consecuencia, los niveles de P4 y E2 se mantienen en concentraciones basales durante el anestro.

### **1.6. Administración de progesterona: dispositivo intravaginal CIDR y concentración de progesterona sérica**

El CIDR (Controlled Internal Drug Release, Pfizer, Auckland, NZ) es un dispositivo intravaginal de elastómero de silicona impregnado con 0,3 g de P4, comúnmente utilizado en ovejas para sincronizar los celos durante la estación reproductiva (Wheaton et al. 1993). Al utilizar un CIDR en una oveja, se inicia una liberación progresiva de P4 (molécula igual a la natural, que por lo tanto puede ser

metabolizada de igual manera), la que se mantiene en concentraciones luteales por lo menos a lo largo de 14 días (Hamra et al. 1986).

Las ovejas tratadas con un CIDR durante 14 días presentan un perfil de concentración de P4 sérica similar al registrado durante una fase luteal. Las dos principales diferencias están en la dinámica del aumento y de la disminución de las concentraciones séricas de P4 que se producen al insertar o al remover un CIDR. Al insertar los CIDRs, el aumento de las concentraciones séricas de P4 ocurre de manera más rápida que en una fase luteal, alcanzando un pico de P4 a las dos horas de insertado (Ainsworth & Downey, 1986). Luego del pico inicial, los niveles de P4 decrecen paulatinamente (Ainsworth & Downey, 1986) (Figura 6). Al remover un CIDR después de 12-14 días de tratamiento se observa una reducción brusca de la concentración de P4 sérica, llegando a concentraciones basales a la hora (Vilariño et al. 2010; Ainsworth & Downey, 1986), proceso que en una fase luteal lleva aproximadamente 3 días (Bartlewski et al. 1999).

En síntesis, el CIDR es una manera práctica y efectiva de realizar un tratamiento sostenido con P4 en hembras ovinas, permitiendo la circulación de esta hormona en concentraciones séricas similares a las luteales, y sin la necesidad de administraciones frecuentes. Además, la P4 impregnada en un CIDR sigue el mismo proceso de metabolización que la secretada por el propio animal.

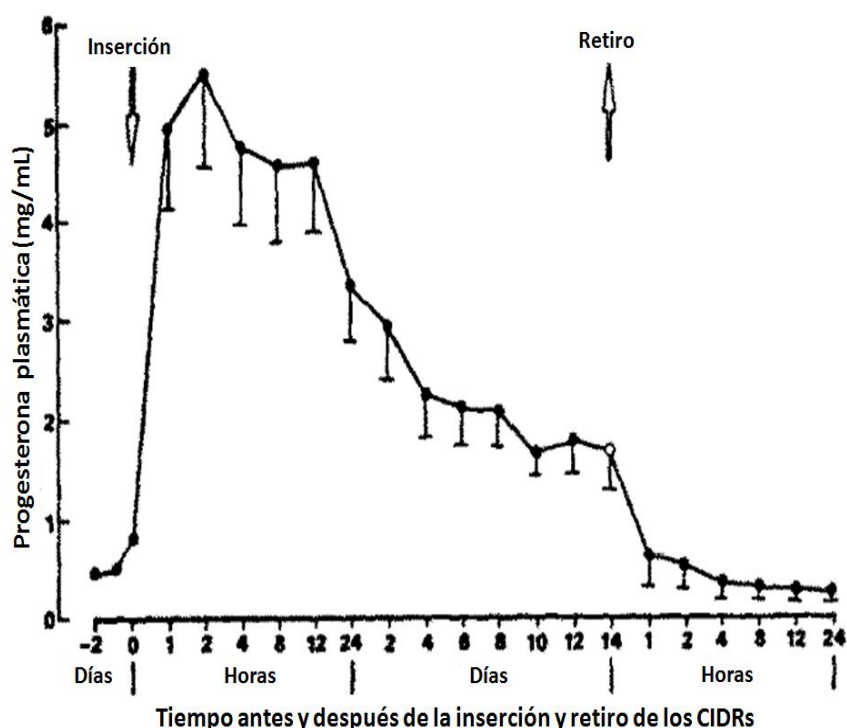


Figura 6. Concentración sérica de progesterona en ovejas ovariectomizadas antes, durante, y después del tratamiento con CIDR por 14 días (Modificado de Ainsworth & Downey, 1986).

## **1.7. Desafíos estresantes**

Para estudiar los efectos del tratamiento con P4 o de la suspensión del mismo sobre la respuesta de estrés en ovejas en anestro, se utilizaron como modelos dos situaciones estresantes el destete y el TAS.

### **1.7.1 Destete**

Luego del parto la oveja desarrolla selectivamente un fuerte vínculo con su cría (Poindron et al. 2006), el que disminuye gradualmente a lo largo del periodo de lactación y termina con el destete espontáneo del cordero, el que ocurre a los 4 a 5 meses de edad (Arnold et al. 1979; Lynch et al. 1992). Según Weary et al. (2008), el destete se caracteriza por la ruptura del vínculo madre cría, el reemplazo de leche por comida sólida y la independencia social de la cría. Para Arnold et al. (1979) la producción de leche de las ovejas es uno de los principales factores que determinan la edad del destete natural de sus corderos. Hinch et al. (1987) determinaron que la distancia oveja-cordero aumenta con el aumento de la edad del cordero, al mismo tiempo la cría queda más tiempo separada de la madre a medida que se va familiarizando y adaptando a la ingestión de alimentos sólidos (Weary et al. 2008). La edad del destete natural puede variar de acuerdo a la situación nutricional de las ovejas, factor que afecta principalmente la producción de leche por parte de la madre (Berger, 1979). El destete natural involucra cambios sociales, fisiológicos y comportamentales en la madre y en la cría, generando un proceso gradual de separación.

La edad del destete artificial varía de acuerdo al objetivo del establecimiento de producción ovina. Según Napolitano et al. (2008), los establecimientos de producción lechera generalmente realizan un destete temprano, entre los 0 y 2 días de nacidos. En Uruguay hay un predominio de producción ovina para lana y carne, siendo la edad del destete más tardía, variando entre 45 días y 4 meses. En este contexto, la remoción abrupta de los corderos antes de la edad del destete natural es una situación estresante para la oveja y para el cordero, la que produce respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés. Luego de la separación de su cordero, la oveja aumenta la frecuencia de vocalizaciones (Orgeur et al. 1998; 1999) y el tiempo que pasa parada, y reduce su tiempo echada y rumiando (Cockram et al. 1993). Asimismo, el destete provoca cambios fisiológicos agudos indicadores de estrés en las ovejas, como el aumento en la concentración sérica de cortisol (Pérez-León et al. 2006). Si bien hasta el momento no existen trabajos publicados en ovinos, en vacas, la concentración de albúmina sérica disminuye y de proteínas totales aumenta durante los primeros días luego del destete (Ungerfeld et al. 2011).

El destete temprano de corderos, realizado a los 2 días, puede disminuir la respuesta de anticuerpos a un desafío antigénico (Napolitano et al. 1995). En concordancia, el destete abrupto de los corderos puede aumentar la susceptibilidad a enfermedades, siendo estos más susceptibles a contraer parásitos gastrointestinales (Orgeur et al. 1999). Por lo tanto, considerando que el destete es uno de los manejos más estresantes para la oveja, es importante desarrollar alternativas para disminuir estas repuestas.



### **1.7.2. Test de aislamiento social**

El TAS, conocido como “open field test”, fue originalmente desarrollado para ser utilizado en animales de laboratorio con el objetivo de determinar las respuestas de emoción, miedo y/o estrés (Archer, 1973). Según Hall (1934) es un medio para medir los cambios de la actividad simpática y la respuesta comportamental. Luego este test fue adaptado para rumiantes, incluyendo los ovinos (Zito et al. 1975; Torres-Hernandez & William Hohenboken, 1979; Forkman et al. 2007). Como el ovino es una especie gregaria (Lynch, 1992) presenta una marcada respuesta de estrés al TAS.

El TAS consiste en introducir al animal individualmente en un área desconocida (encerrada por paredes, con espacio para su libre locomoción) y aislarlo de otros animales por un determinado tiempo (Ferreira et al. 1992; Roemeyer & Boissou 1992; Pedernera-Romano et al. 2010). En ovinos, durante el TAS se han reportado cambios comportamentales que reflejan miedo, como un aumento en la frecuencia de vocalización, micción, defecación y locomoción, y una reducción en los comportamientos exploratorios (olfateos y lamidos) (Forkman et al. 2007). Además, en ovinos el TAS genera un aumento en la concentración de cortisol (Parrott et al. 1987), glucemia (Al-Qarawi & Badreldin, 2005), temperatura y frecuencia cardíaca y respiratoria (da Costa et al. 2004; Pedernera-Romano et al. 2010; Damián, 2011). Dentro de este marco, el TAS puede ser utilizado en ovejas para determinar la magnitud de la respuesta de estrés a partir de cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERALES**

### **2.1. Hipótesis general**

El tratamiento con niveles luteales de P4 en ovejas en anestro reduce la respuesta de estrés al destete, y la suspensión del tratamiento con P4 aumenta la respuesta de estrés al test de aislamiento social.

### **2.2. Objetivo general**

Determinar si el tratamiento con niveles luteales de P4 reduce la respuesta de estrés al destete, y si la suspensión del tratamiento con P4 aumenta la respuesta de estrés al test de aislamiento social en ovejas en anestro.

## **3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

### **3.1. Estrategia general**

En esta Tesis se realizaron 2 experimentos en los que se utilizaron ovejas en anestro para evitar los posibles efectos de P4 y E2 endógenos. Esto permitió controlar los efectos producidos exclusivamente por el tratamiento exógeno con P4 o por la suspensión del mismo, y eliminar las posibles fluctuaciones en las concentraciones de P4 y E2, las que podrían interferir con las respuestas a estudiar.

Se optó por utilizar CIDRs para realizar el tratamiento con P4 considerando que los mismos pueden liberar P4 en niveles luteales durante al menos 14 días sin necesidad de cambiar los dispositivos frecuentemente. No se aplicaron dispositivos sin P4 en el grupo control porque no es posible obtener CIDRs sin P4 impregnada, y existe evidencia experimental de que los CIDRs usados aun pueden liberar P4 (Ungerfeld, 2009). Para evitar diferencias en el manejo entre los grupos, todas las veces que se manejaron ovejas para insertar o retirar los CIDRs, las ovejas control recibieron el mismo manejo.

Se utilizaron ovejas de raza Polwarth (Ideal) ya que es una raza caracterizada por su habilidad maternal y su alto gregarismo, lo que permitió asegurar que se obtendrían las respuestas de estrés al destete y al TAS.

### **3.2. Experimento 1**

En este Experimentos se cambiaron los CIDRs con al menos de 14 días de intervalo para asegurar que se mantuvieron las concentraciones de P4 en niveles luteales.

#### **3.2.1. Estudio 1:**

#### **Efectos del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas**

Dado que no existían reportes en la literatura de trabajos en rumiantes relacionando el tratamiento con P4 y la respuesta de estrés, en este experimento se planteó aplicar un tratamiento crónico con P4, con duración de 32 días, iniciándose a los 30 días posparto, para así asegurar que si el tratamiento tenía efecto sobre la respuesta de estrés al destete este se manifestara en los registros. Se utilizaron ovejas posparto, por lo que se consideró el tiempo necesario para finalizar los procesos de involución uterina antes del inicio del tratamiento (Rubianes & Ungerfeld, 1993). Además, se consideró que el tiempo de tratamiento coincidiera con el momento en que el proceso de destete natural no estuviera muy avanzado, para así obtener una respuesta de estrés al destete; y que los corderos estuviesen suficientemente desarrollados para que luego de destetados pudiesen vivir y desarrollarse normalmente sin sus madres.

### **3.2.2. Estudio 2:**

#### **Efectos del tratamiento con progesterona sobre la producción y composición de leche en ovejas**

El presente estudio fue diseñado con el fin de determinar si existían diferencias provocadas por el tratamiento con P4 sobre la producción y composición de la leche. Se optó por un tratamiento con CIDRs con una duración de 16 días dado que el objetivo era solamente determinar si existían diferencias en la producción y composición de la leche entre ovejas tratadas y ovejas no tratadas. El primer ordeño durante el tratamiento fue realizado a los 9 días de iniciado el mismo, tiempo en que probablemente los posibles efectos de la P4 sobre la producción y composición de la leche pudiesen ser evidenciados. Con el fin de aumentar el período de registros durante el tratamiento, se realizaron dos ordeños más durante el tratamiento con P4, a los 12 y 16 días.

### **3.3. Experimento 2:**

#### **Efectos de la suspensión del tratamiento con progesterona sobre la respuesta de estrés al test de aislamiento social en ovejas**

No existían trabajos previos en rumiantes en los que se hubiese evaluado la respuesta de estrés luego de la suspensión del tratamiento con P4. Se optó por un tratamiento durante un tiempo similar al de una fase luteal (13 días). Por otro lado, se utilizaron ovejas en anestro con el fin de evitar el aumento de los E2 y la manifestación de celo, con los cambios comportamentales que implica, al retirar los CIDRs. Dado que el aumento de E2 hubiera enmascarado los efectos generados de por sí solo por la suspensión del tratamiento con P4.

## **4. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN EXPERIMENTAL**

### **4.1. EXPERIMENTO 1: Efectos del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas**

#### **4.1.1. Introducción**

##### **Destete, progesterona y respuesta de estrés**

En trabajos en roedores se ha demostrado que el tratamiento con P4 puede reducir la respuesta de estrés. Por otro lado, el destete artificial realizado antes de la edad de destete natural es una situación estresante para la oveja y para el cordero, y por tanto produce respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés. Dentro de este marco teórico, se propone que el tratamiento con P4 puede reducir la respuesta de estrés, pudiendo ser utilizado en la producción animal durante manejos estresantes como el destete.

##### **Progesterona y producción y composición de la leche**

De acuerdo a nuestro conocimiento no existen estudios publicados en ovinos que hayan determinado cómo el tratamiento con niveles luteales de P4 puede afectar la producción y/o la composición de la leche.

Considerando que el tratamiento con P4 podría afectar la producción y composición de leche, y por consiguiente el estadio de desarrollo de los corderos y el tiempo de destete natural, estos posibles cambios podrían generar diferencias en la respuesta de estrés de ovejas al destete.

En los pocos estudios reportados, se utilizaron progestágenos sintéticos o dosis supra fisiológicas de P4. Smith & Inskoop (1970) no encontraron efectos del tratamiento con progestágenos (medroxiprogesterona y acetato de flurogestona) sobre la producción de leche en ovejas. Por otro lado, Manalu et al. (2000) encontraron que ovejas lactantes superovuladas (y que por tanto producen una alta cantidad de P4) producen más leche que aquellas no tratadas. Más aún, McKusick et al. (2002) reportaron que las ovejas tratadas con dosis supra fisiológica de P4 (provocada por un CL sumado al tratamiento con CIDRs) producen mayor producción de leche. Por tanto, es importante destacar posibles diferencias en la producción y composición de leche de acuerdo a la dosis de P4 utilizada, o en el período de lactación en que se realizó el tratamiento experimental.

Por tanto, dada la falta de antecedentes específicos, para esta Tesis fue necesario estudiar si la P4 afecta la producción y composición de leche, y por lo tanto el desarrollo de los corderos.

#### **4.1.2. Hipótesis específicas**

El tratamiento con niveles luteales de P4 disminuye las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas en anestro.

#### **4.1.3. Objetivos específicos**

Determinar si el tratamiento con niveles luteales de P4 afecta:

- ✓ Las respuestas comportamentales y fisiológicas al destete en ovejas en anestro.
- ✓ La producción y composición de la leche así como el peso de los corderos.

#### **4.1.4. Metodología general**

El estudio se realizó en la Estación Experimental La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (34°28'S), durante octubre-noviembre (período de anestro estacional). Se utilizaron 26 ovejas Polwarth multíparas de partos simples. Durante el experimento, las ovejas permanecieron pastoreando en pradera de trébol rojo y alfalfa con agua *ad libitum*. Se registró el sexo y el peso de los corderos al parto y se identificaron con una caravana para conocer la díada madre-cordero.

##### **4.1.4.1. Estudio 1: Efectos del tratamiento con progesterona sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas**

Se utilizaron 15 ovejas con un peso de  $47,4 \pm 1,6$  kg (media  $\pm$  EE), y una condición corporal de  $1,9 \pm 0,1$  (escala 1 a 5, siendo 1=emaciada y 5=obeso; Russel et al. 1969). Las ovejas fueron adjudicadas a dos grupos experimentales homogéneos de acuerdo al día del parto cuando tenían entre 25 y 35 días posparto. A los 30 días posparto a 7 ovejas se les colocó un CIDR (E1E1-P4) quedando las 8 ovejas restantes sin tratamiento (E1E1-C). Los CIDRs fueron cambiaron los días -19, -8 y 0 (Día 0= destete). Las ovejas E1E1-C fueron manejadas de la misma manera que las E1E1-P4 durante las inserciones o retiradas de los CIDRs.

El Día -5, los dos grupos de ovejas se trasladaron a dos encierros de 40 x 30 m, separados entre sí por 15 m, en los que las ovejas pastaban en pradera de trébol rojo y alfalfa y tenían libre acceso a agua. El destete se realizó a las 06:30 h del Día 0 (59 días posparto), momento que se separaron los corderos de las madres y se los alojó en encierros cerrados, sin contacto olfativo o auditivo con sus madres.

#### **Muestras sanguíneas**

Se obtuvieron muestras sanguíneas por venopunción de la yugular en los Días -35,-29,-23,-19,-13,-8,-4, 0 y 3. Las muestras se colectaron en tubos sin anticoagulante y se centrifugaron por 10 min a 1500xg. El suero obtenido fue congelado a -20°C hasta su posterior análisis.

## Registros comportamentales

Cuatro observadores registraron los 8 diferentes comportamientos (Cuadro I) de cada oveja en cada grupo entre el Día -3 y el Día 3. Se realizaron observaciones tipo scan, cada 10 min durante 3 h en la mañana (7:30-10:30 h) y 3 h en la tarde (16:30-19:30h), totalizando 38 registros por día. Para facilitar los registros desde afuera de los potreros las ovejas fueron marcadas con diferentes colores en el cuerpo. Cada 10 min se registró durante 30 s la emisión de vocalizaciones (muestreo 0/1; Lehner, 1996). Los días anteriores al destete (Días -1, -2 y -3), durante los mismos horarios se realizaron observaciones focales del grupo para registrar el número de veces en que las ovejas amamantaban a sus corderos.

Cuadro I. Comportamientos registrados en las ovejas para evaluar los cambios comportamentales al destete.

| Comportamiento | Descripción  |
|----------------|--|
| Parada         | Posicionada con los miembros anteriores y posteriores extendidos           |
| Echada         | Acostada en posición de descanso   |
| Rumiando       | Regurgitando y remasticando el bolo de comida                              |
| Pastando       | Consumiendo pastura con la cabeza baja                                     |
| Caminando      | Moviendo los miembros anteriores y posteriores con la cabeza baja o erecta |
| Costeando      | Moviendo se 1-2 m paralelamente al alambrado                               |
| Amamantando    | El cordero succionando el pezón de la ubre                                 |
| Vocalizando    | Balando con la boca abierta o cerrada                                      |

## Progesterona sérica

Se midió la P4 sérica de las muestras colectadas en los Días -35 y -29 para confirmar el anestro de todas las ovejas utilizadas (se consideró como concentración luteal  $>3,2\text{nmol/L}$ ). Con el mismo propósito, se midió la P4 de las muestras obtenidas los Días -8 y 0 en el grupo E1E1-C. Se descartó una oveja de grupo E1E1-C porque no estaba en anestro, quedando 7 ovejas en este grupo. Además, se determinó la concentración sérica de P4 en las muestras colectadas en los Días -29 (inmediatamente antes de insertar los CIDRs), -23, -19, -13, -8, -4, 0 y 3, para caracterizar el perfil generado por el tratamiento de las ovejas E1E1-P4.

Se determinó la P4 sérica en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, California, EUA). La sensibilidad analítica del ensayo fue de 0,25 nmol/L, y el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 10,7%.

### **Determinación de proteínas séricas**

Se determinó la concentración de proteínas totales y albúmina de los sueros colectados en los Días -4, 0 y 3, en el Área de Bioquímica a través de la técnica de Biuret y por un kit comercial (Bio-Systems, Barcelona, España), respectivamente. Se estimó la concentración sérica de globulinas a partir de la diferencia entre albúmina sérica y proteínas séricas totales (Säkkinen et al. 2005) en los Días -4, 0 y 3.

### **Peso de los corderos**

Los Días -29, -13, -4 y 0 se registró el peso de los corderos.

#### **4.1.4.2. Estudio 2: Efectos del tratamiento con progesterona sobre la producción y composición de leche en ovejas**

Se determinó la producción y la composición de la leche de 11 ovejas que parieron en el mismo periodo que las utilizadas en el Estudio I. Estas ovejas pesaron  $46,2 \pm 1,7$  kg, tuvieron una condición corporal de  $2,02 \pm 0,03$ , y fueron manejadas en las mismas condiciones de las del Estudio I. Cuando tenían entre 31 y 44 días posparto las ovejas fueron adjudicadas a dos grupos experimentales de acuerdo con la fecha de parto y peso inicial de la leche ( $1,35 \pm 0,13$  kg.d<sup>-1</sup>). Se colocaron CIDRs a partir de los 35 días posparto a 6 ovejas (grupo E1E2-C) por 16 días (cambiándolos en el Día 44 posparto), quedando otras 5 ovejas sin tratamiento (grupo E1E2-P4). Las ovejas E1E2-C se manejaron de la misma manera que las E1E2-P4 durante las inserciones o retiradas de los CIDRs.

### **Producción y composición de la leche**

Los Días 24 y 35 posparto (antes del tratamiento con P4), y 44, 47 y 51 posparto (durante el tratamiento con P4) se ordeñaron manualmente a todas las ovejas. La producción de leche fue estimada usando la técnica de ordeño con oxitocina previamente validada por Sphor et al. (2011). Para ello las ovejas fueron separadas de sus corderos permaneciendo en corrales (con agua y fardo de alfalfa), y se les inyectó 5 UI de oxitocina (Hipofamina, Laboratorios Dispert, Montevideo, Uruguay). Inmediatamente se ordeñó a las ovejas hasta agotar la leche de las dos glándulas mamarias. A las 4 h se realizó un segundo ordeño utilizando la misma técnica, y posteriormente se pesó la leche de cada oveja producida. Una vez finalizado el segundo ordeño, las ovejas se juntaron nuevamente con sus corderos. Se calculó la producción de leche de acuerdo a Doney et al. (1979) utilizando la cantidad total de leche obtenidos en el segundo ordeño (correspondiente a 4 h de producción) y calculando la producción estimada para un periodo de 24 h.

Para analizar la composición química de la leche se colectó una muestra de cada oveja (aproximadamente 40 mL) del segundo ordeño, preservándola en Lactopol (2-Bromo-2-Nitropropano-1,3-diol) y congelándola inmediatamente,



manteniéndola a  $-20^{\circ}$  hasta el análisis de la composición (grasa, proteína y lactosa). Los análisis de la composición de la leche se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela utilizando un equipo Lactoscan Milkanalyzer (Nova Zagora, Bulgaria).

#### 4.1.5. Análisis Estadístico

Se calculó el porcentaje de observaciones en el que cada oveja realizó cada comportamiento, el que es presentado como media  $\pm$  EE. Se comparó la frecuencia de amamantamiento por ANOVA. Las frecuencias de los otros comportamientos, el peso de los corderos, las proteínas séricas totales, albúmina y globulinas (Estudio I), y la producción y composición de leche (Estudio II) fueron comparadas entre los tratamientos con ANOVA para mediciones repetidas, utilizando el modelo mixto de SAS (2003; SAS Institute, Carolina del Norte, EUA). Para las variables del Estudio I, se incluyó el valor medio de los datos de todos los días anteriores al tratamiento con P4 en el modelo como covariable. El modelo incluyó los tratamientos (E1E1-P4 vs. E1E1-C y E1E2-P4 vs. E1E2-C), el tiempo, y la interacción entre los tratamientos y el tiempo como efectos fijos, y la oveja de cada grupo como un efecto al azar. Se hicieron las comparaciones Post-hoc con LSD.

#### 4.1.6. Resultados

##### 4.1.6.1. Estudio 1

##### Determinación de progesterona durante el tratamiento

Las concentraciones de P4 sérica de las ovejas E1E1-P4 durante el tratamiento fueron similares a los valores de una fase luteal normal (Figura 7).

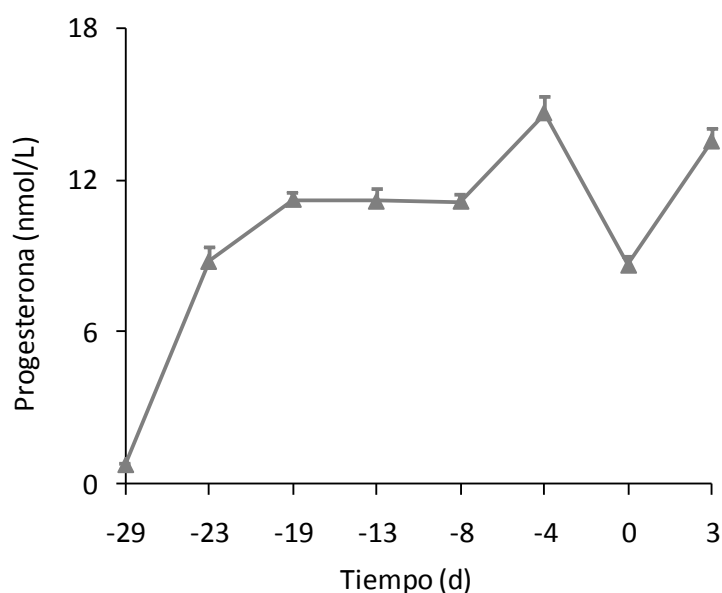


Figura 7. Concentración de progesterona (media  $\pm$  EE) en 7 ovejas tratadas con CIDR durante 32 días. Los CIDRs se insertaron el Día -29, y fueron cambiados los Días -19, -8 y 0 (Día 0: destete).

## Peso de los corderos

El peso de los corderos aumentó con el tiempo ( $P=0,001$ ) de manera similar en ambos grupos (Figura 8).

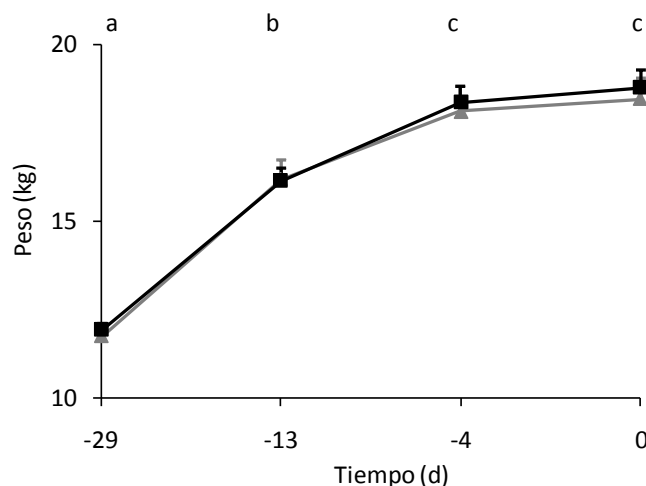


Figura 8. Peso corporal (media  $\pm$  EE) de corderos durante el tratamiento de sus madres con CIDR durante 29 días ( $\blacktriangle$ ) o de madres no tratadas ( $\blacksquare$ ). El tiempo es en relación al día del destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los días ( $P<0,0001$ ).

## Registros Comportamentales

No hubo diferencia entre grupos en el porcentaje de observaciones en que las ovejas fueron observadas amamantando a sus corderos ( $8,8 \pm 1,2$  vs.  $10,4 \pm 0,4$  % para las ovejas E1E1-P4 y E1E1-C respectivamente;  $P=0,11$ ).

No hubo efecto de grupo para ninguno de los comportamientos registrados, excepto para el comportamiento caminando. El porcentaje de observaciones en que se observaron las ovejas del grupo E1E1-P4 estaban caminando tendió a ser mayor que del grupo E1E1-C ( $P=0,09$ ) (Figura 9C).

Todos los otros comportamientos registrados cambiaron con el tiempo ( $P<0,01$ ). El porcentaje de observaciones en que se observaron las ovejas paradas (Figura 9A) y caminando tendió a aumentar el Día 0 ( $P=0,1$ ), y retornó a los valores iniciales el Día 3. El porcentaje de observaciones en que las ovejas estuvieron echadas (Figura 9B), pastando y rumiando (Figura 10A y B) disminuyeron en el Día 0 ( $P=0,0001$ , y  $P=0,04$  respectivamente). El porcentaje de observaciones en que se registraron las ovejas pastando, rumiando y echadas volvieron a los valores iniciales al Día 1 y 2 respectivamente.

Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ( $P=0,03$ ) para el comportamiento echada; lo que se explica por el hecho de que mientras no cambió el porcentaje de observaciones en que las ovejas E1E1-P4 estaban echadas del Día 0 al Día 1, este porcentaje si aumentó el porcentaje de observaciones en que las ovejas E1E1-C estuvieron echadas en el mismo período. Se observó el comportamiento costeando solo en el Día 0 (Figura 11A), siendo mayor el porcentaje de

observaciones en las ovejas E1E1-C que en las E1E1-P4 ( $P=0,0007$ ). En el Día 0 el porcentaje de vocalizaciones fue mayor en las ovejas E1E1-C que en las E1E1-P4 ( $P=0,04$ ; Figura 11B).

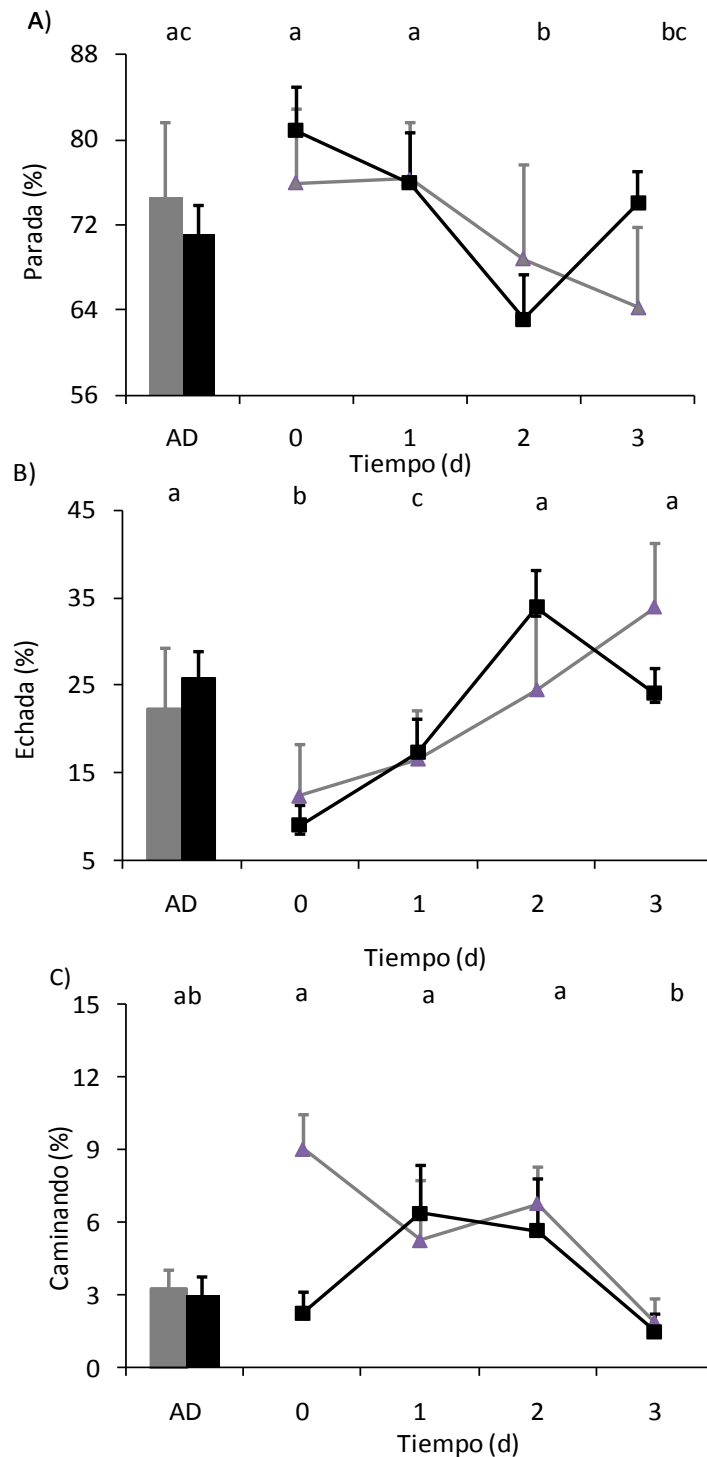


Figura 9. Frecuencia de registros (media  $\pm$  EE) en que se observó cada oveja parada (A), echada (B) y caminando (C) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días (-▲-) y de ovejas no tratadas (-■-). AD: periodo antes del destete que está representado por barras; el valor representado es la media de los tres días antes del destete (Día -3 al Día -1). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ( $P < 0,02$ ).

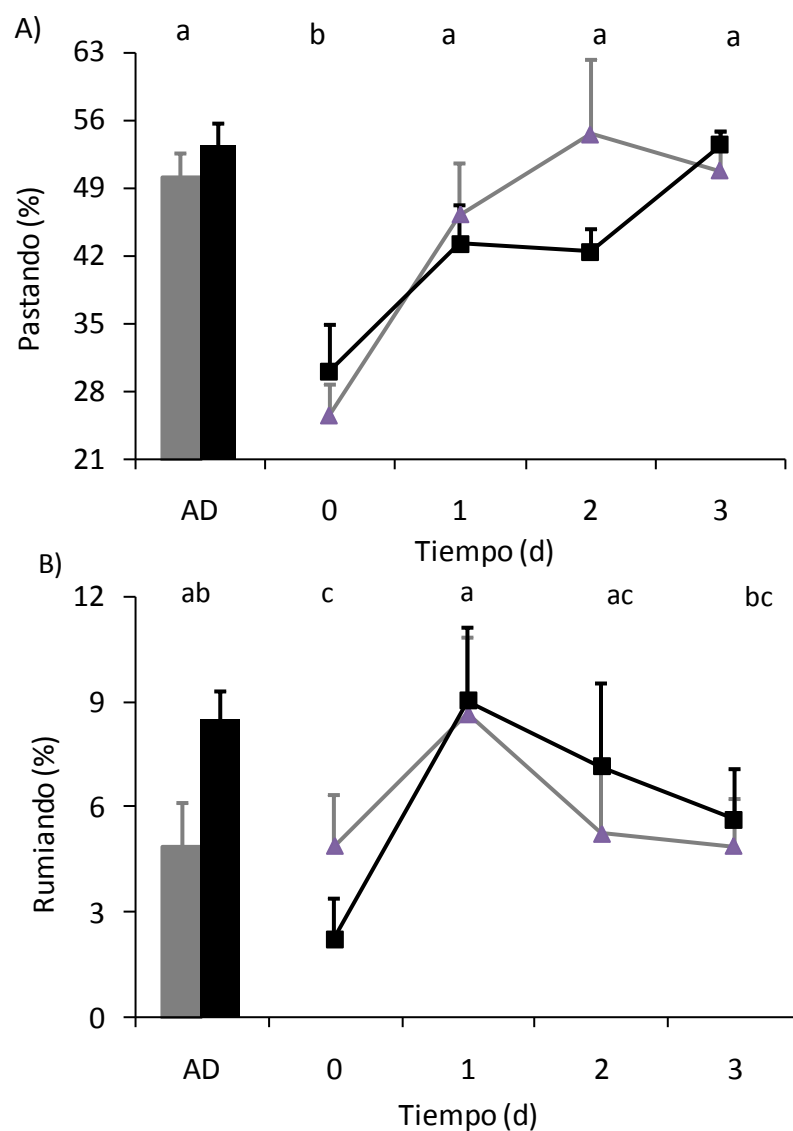


Figura 10. Frecuencia de registros (media  $\pm$  EE) en que se observó cada oveja pastando (A) y rumiando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días (-▲-) y de ovejas no tratadas (-■-). AD: período antes del destete que está representado por barras; el valor representado es la media de los tres días antes del destete (Día -3 al Día -1). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ( $P < 0,01$ ).

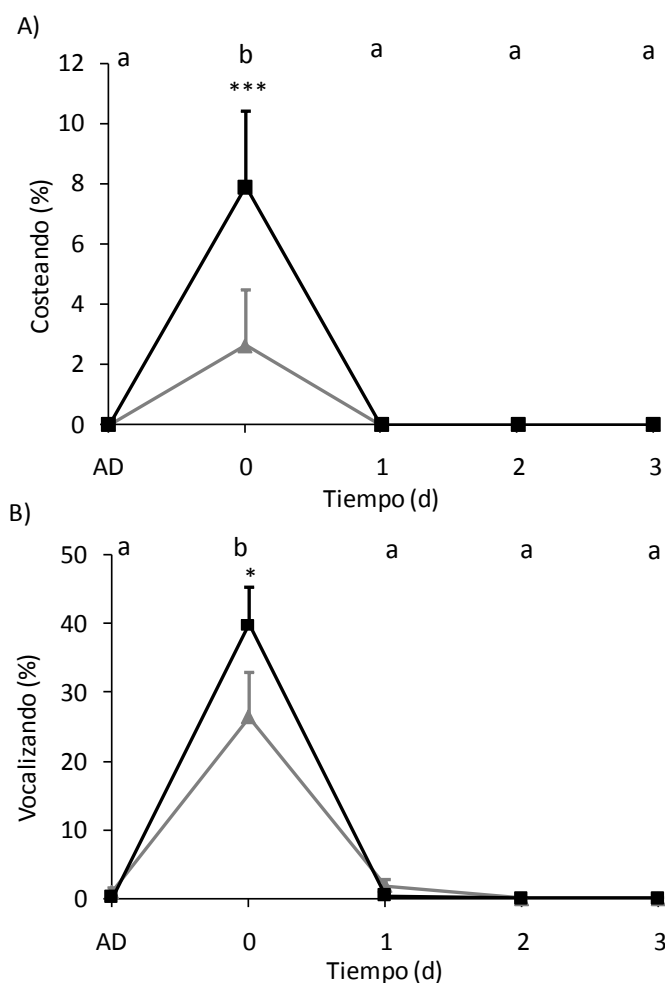


Figura 11. Frecuencia de registros (media  $\pm$  EE) en que se observó cada oveja costeando (A) y vocalizando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días (-▲-) y de ovejas no tratadas (-■-). AD: periodo antes del destete; el valor representado es la media de los tres días antes del destete (Día -3 al Día -1). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ( $P < 0,0001$ ). Uno y tres asteriscos indican diferencias entre los grupos ( $P < 0,05$  y  $P < 0,001$  respectivamente).

### Proteínas séricas

Las ovejas del grupo E1E1-P4 presentaron valores de proteínas séricas totales mayores ( $P=0,04$ ) que el grupo E1E1-C. Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ( $P=0,05$ ): mientras no hubo cambios en los valores de proteínas séricas totales en las ovejas E1E1-P4 del Día 0 al Día 3, estas disminuyeron en las ovejas E1E1-C ( $P=0,04$ ). Al Día 3 fueron mayores en las ovejas E1E1-C que en las E1E1-P4 ( $P=0,005$ ) (Figura 12A).

La concentración de albúmina y globulinas séricas cambió con el tiempo ( $P=0,0002$  y  $P=0,001$ , respectivamente). La albúmina sérica presentó una tendencia para efecto de grupo y para interacción entre tratamiento y grupo ( $P=0,08$  y  $P=0,1$  respectivamente; Figura 12B). Las ovejas E1E1-P4 presentaron mayores valores de globulinas séricas ( $P=0,002$ ) que las ovejas E1E1-C. Hubo una interacción ( $P=0,01$ ) entre tratamiento y tiempo para globulinas séricas, explicada por el hecho de que en

el Día 3 las ovejas E1E1-P4 presentaron mayores valores que las E1E1-C ( $P=0,0008$ ; Figura 12C).

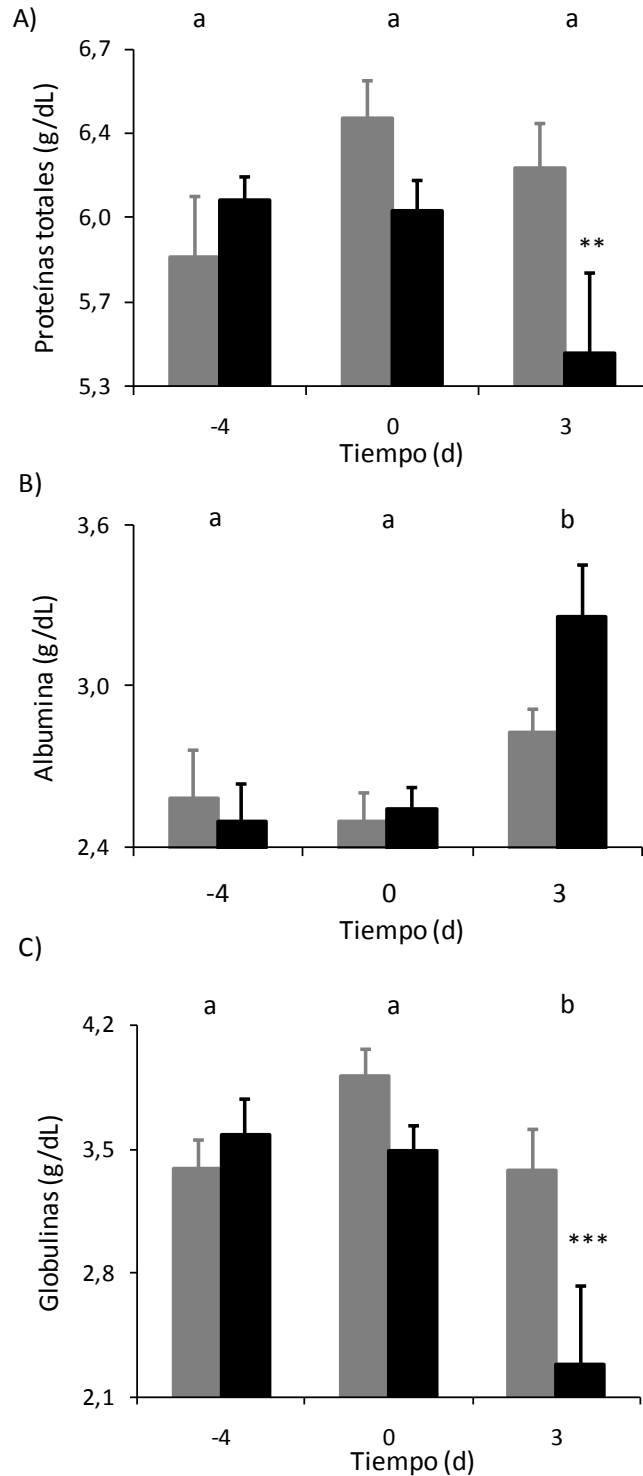


Figura 12. Concentraciones de proteínas séricas totales (A), albúmina (B) y globulinas (C) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días (barra gris) y de ovejas no tratadas (barra negra). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ( $P<0,0004$ ). Dos y tres asteriscos indican diferencias entre los grupos ( $P<0,01$  y  $P<0,001$  respectivamente).

#### 4.1.6.2. Estudio 2

No hubo diferencias entre los grupos en la producción de leche ni en los contenidos de proteína, grasa y lactosa (Figura 13A a D). La producción de leche disminuyó con el tiempo ( $P<0,0001$ ) y todos los componentes de la leche analizados cambiaron a lo largo del tiempo ( $P<0,004$ ).

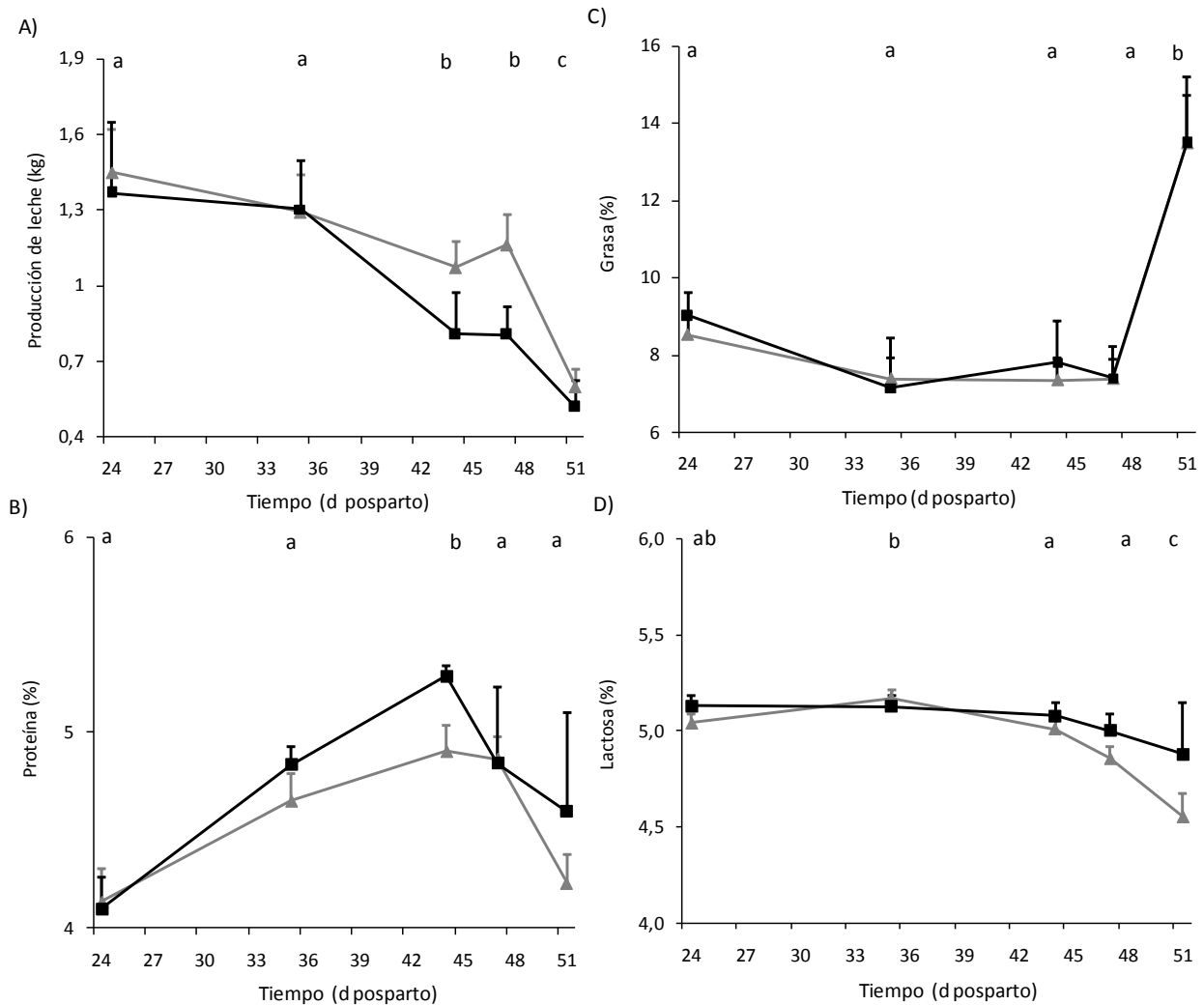


Figura 13. Producción y composición de leche (media  $\pm$  EE) en ovejas tratadas con CIDR durante 16 días (-▲-) y en ovejas no tratadas (-■-). Diferentes letras indican diferencias entre los días ( $P<0,005$ ).

#### 4.1.7. Discusión

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar nuestra hipótesis de que el tratamiento con P4 reduce las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés al destete abrupto de la oveja. Las principales variables comportamentales (costear y vocalizar), y la mayoría de las variables fisiológicas (concentraciones de proteínas séricas totales y globulinas séricas) consideradas todas indicadoras de respuesta de estrés al destete en ovejas fueron disminuidas por el tratamiento con P4 en relación a las controles. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en roedores los que demostraron que el tratamiento con P4 reduce la respuesta de estrés o ansiedad (Barbaccia et al. 2001). Es importante considerar que estas diferencias fueron claramente detectadas a pesar de que en el experimento se utilizó un pequeño número de animales. El hecho de no haber encontrado efectos del tratamiento con P4 sobre la producción y composición de leche y peso de los corderos indica que las diferencias entre grupos en la respuesta de estrés al destete no es consecuencia de que el proceso de destete natural esté en diferentes estadios entre grupos, y que por lo tanto presenten diferentes intensidades en el vínculos madre-cría. Por lo tanto, las diferencias entre grupos en las respuestas de estrés al destete es debido a un efecto directo de la P4.

Por lo tanto nuestros resultados confirman la existencia de un efecto del tratamiento con P4 en la respuesta de las ovejas al destete abrupto. Aunque nuestros procedimientos experimentales no nos permiten concluir en relación a los mecanismos, podemos especular que la P4 es solamente un sustrato para la formación de las moléculas neuroactivas, los metabolitos que contienen el grupo  $3\alpha$ -hydroxy (Lambert et al. 2009). Estos resultados abren una interesante alternativa para minimizar el efecto de manejos estresantes en animales de producción.

Destetar los corderos causó una reducción en la concentración de las proteínas séricas totales y en la concentración de las globulinas séricas en las ovejas, respuesta que fue reducida por el tratamiento con P4. Tal cual como se ha reportado en corderos después de un respuesta de estrés (Apple et al. 1993), las proteínas séricas totales se redujeron después del destete en las ovejas no tratadas. En nuestro estudio, la reducción en la concentración de las proteínas totales en las ovejas no tratadas después del destete, es explicada por la reducción en la concentración de las globulinas séricas. En este sentido, Napolitano et al. (1995) reportaron que la separación temprana, a los 2 días, de la madre disminuye el título de anticuerpos en corderos. Por tanto, teniendo en cuenta que los valores de globulinas séricas de las ovejas no tratadas indican un estado de hipoglobulinemia (valores normales= 3,1 - 5,1 g/dL; Hearly & Falk, 1974), esto podría indicar un estado de inmuno-deficiencia (Allison, 2012). Dado que el destete es un manejo estresante puede dejar el animal más susceptible a enfermedades. Por ejemplo, en corderos recientemente destetados hay un aumento de la susceptibilidad a parasitosis gastrointestinales (Orgeur et al. 1999). Por lo tanto, el tratamiento con P4 redujo la susceptibilidad a enfermedades de las ovejas después del destete.

De acuerdo con nuestro conocimiento esta es la primera caracterización completa de las respuestas comportamentales de las ovejas al destete. La respuesta general es similar a las previamente descritas en ovejas (Napolitano et al. 2008) y vacas (Weary & Chua, 2000; Flower & Weary 2001; Ungerfeld et al. 2011). En



síntesis, se observó una rápida y marcada respuesta comportamental en el día del destete, seguido de un rápido retorno a los valores iniciales. El aumento en el porcentaje de observaciones en que las ovejas estuvieron costeando y vocalizando, y la reducción en el porcentaje de registros en que las ovejas estuvieron paradas puede estar relacionado con el hecho de que los balidos y la locomoción son utilizados por las mismas para localizar o reunirse con sus crías. El corto período en que estos animales desplegaron estos comportamientos puede ser explicado por lo inefectivo de sus respuestas. Estos comportamientos, al igual que la respuesta fisiológica, generan un importante costo energético. Considerando el alto costo energético, la rápida reducción de estos comportamientos puede estar relacionadas a la falta de respuestas positivas (Weary & Fraser, 1995).

Otro resultado relevante de este estudio fue que la administración de niveles luteales de P4 no afectó la producción y composición de la leche. Esto confirma y amplía los resultados de Smith & Inskip (1970), que reportaron que el tratamiento con medroxiprogesterona y acetato de flurogestona no afectó la producción de leche de las ovejas. Las escasas publicaciones relacionando P4 y producción de leche fueron realizadas en ovejas superovuladas (McKusick et al. 2002), o tratadas con concentraciones supra-fisiológicas provocadas por un CL y P4 exógena (Manalu et al. 2000). En este experimento ninguna ovejas estaba ciclando, y la concentración de P4 provocada por el tratamiento fue similar a las observadas durante una fase luteal normal. Esto permite descartar posibles efectos de las concentraciones luteales de P4 sobre la producción y composición de la leche.

Estos resultados también son interesantes desde una perspectiva productiva, ya que el tratamiento con P4 puede ser una alternativa para reducir las respuestas comportamentales y fisiológicas indicativas de estrés por el destete abrupto de las ovejas. Además, dado que el tratamiento con P4 no afecta la producción y composición de la leche, este tratamiento puede ser utilizado en ovejas lecheras para inducir o sincronizar estros sin afectar la producción lechera. Sin embargo, como en nuestro estudio se realizó un tratamiento en un periodo largo de tiempo puede ser difícil su aplicación, por lo que sería interesante testar la efectividad de tratamientos cortos, o incluso de una inyección única de P4 antes del destete.

En conclusión, el tratamiento con P4 redujo las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés del destete, y por tanto el costo energético de estas respuestas. Además, este efecto no fue mediado por cambios en la producción y composición de leche, o peso de los corderos.

## **4.2 EXPERIMENTO 2: Efectos de la suspensión del tratamiento con progesterona sobre la respuesta de estrés al test de aislamiento social en ovejas**

### **4.2.1. Introducción**

En trabajos en roedores se ha demostrado que la suspensión del tratamiento con P4 puede aumentar la respuesta de estrés o ansiedad. Por otro lado, el TAS consiste en aislar a los animales por un corto periodo de tiempo, y dado que los ovinos son una especie altamente gregaria, este test genera una marcada respuesta de estrés. Por lo tanto, someter a los animales al TAS luego de la suspensión del tratamiento con P4 podría aumentar la respuesta de estrés de estos animales.

### **4.2.2. Hipótesis específica**

La suspensión del tratamiento con niveles luteales de P4 aumenta la respuesta de estrés al test de aislamiento social en ovejas en anestro.

### **4.2.3. Objetivo específico**

Determinar si las respuestas fisiológicas y comportamentales al test de aislamiento social son mayores luego de suspender el tratamiento con niveles luteales de P4 en ovejas en anestro.

### **4.2.4. Metodología**

#### **Local de trabajo, animales y su manejo**

El trabajo fue realizado en la estación experimental La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en Colonia, Uruguay, durante la estación de anestro (setiembre-octubre). Se utilizaron 20 borregas Ideal núlparas de un año de edad, que fueron adjudicadas a 2 grupos homogéneos según el peso ( $40,3 \pm 0,8$  kg; media  $\pm$  EE) y condición corporal ( $2,1 \pm 0,04$ ). Los animales permanecieron en dos potreros de 50 X 25 m<sup>2</sup> pastoreando pradera de trébol rojo y alfalfa y libre acceso a agua. Todas las borregas fueron esquiladas 20 días antes del Experimento.

#### **Tratamiento**

Se insertaron CIDRs a 10 borregas (grupo E2-SP4) durante 13 días, y las otras 10 borregas quedaron sin tratamiento (grupo E2-C).

#### **Perfil de progesterona sérica durante el tratamiento y luego de la suspensión del mismo**

Para caracterizar el perfil de P4 durante el tratamiento con CIDR y luego de su retiro, otras 5 borregas ( $40,2 \pm 1,80$  kg; condición corporal =  $2,1 \pm 0,06$ ) fueron tratadas con CIDRs durante 13 días. Se obtuvieron muestras de sangre por venopunción de la yugular en los Días -1 (sin CIDR), 0 (se insertaron los CIDRs), 1,

2, 3, 7, 10, 13 (con CIDR), e inmediatamente y a las 4, 8, 20 y 26 h de retirados los dispositivos.

### Procedimientos experimentales del test de aislamiento social

Para evitar un cambio brusco de ambiente previo al TAS, y agregar un posible factor estresante a los animales, se llevaron los dos grupos cuatro días antes del test a dos corrales con libre acceso a agua y fardo de alfalfa, separados y ubicados en las proximidades de donde se realizó dicho test. Las ovejas E2-SP4 fueron sometidas al TAS 24 h luego del retiro de los CIDRs.

El test consistió en aislar a las borregas en forma individual, durante 10 minutos, en un área novedosa (con piso de 3,0 X 3,5 m<sup>2</sup>, dividido en 16 cuadrantes de 0,66 m<sup>2</sup>, con paredes blancas de 1,55 m de altura), en el que el animal no tenía contacto visual y olfativo con otros animales (Figura 14). Durante el test no permaneció ninguna persona a menos de 20 m, y se registraron las actividades de los animales mediante dos cámaras de video (Sony, DCR-SR85, China) ubicadas en diferentes ángulos. Los tests se realizaron en dos mañanas (8:00-13:00 h), intercalando 5 borregas de cada grupo en cada día. Luego de realizado el test las ovejas eran alojadas en dos corrales desconocidos en el que siempre hubo animales de la misma majada. Se excluyó un animal de cada grupo que salieron del encierro del TAS con movimientos abruptos (quedando 9 animales en cada grupo).

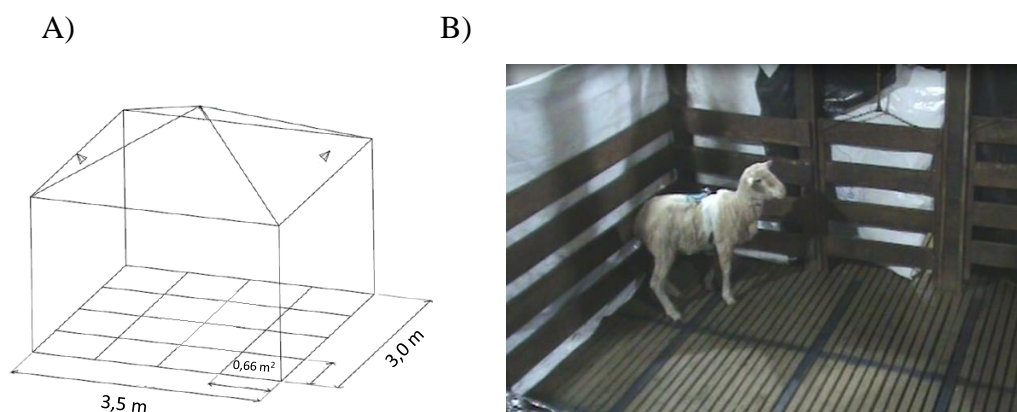


Figura 14: A) Representación esquemática del coral en que se realizó el test de aislamiento social. B) Borrega durante el test de aislamiento social (modificado de Damián, 2011).

### Obtención de muestras sanguíneas

Todas las muestras fueran colectadas por venopunción yugular. Se colectaron muestras de todas las ovejas en los Días -11 y -2 (Día 0: cuando se insertaron los CIDRs). Se colectaron muestras en relación al TAS, la primera muestra 5 min antes del TAS (tiempo -5), la segunda al salir del test (tiempo 0), y a los 10, 20, 30, 45 y 60 min luego del TAS. Se colocaron las muestras de todos los tiempos en tubos sin anticoagulante. En los tiempos -5, 0, 30 y 60 min, se también se colectaron muestras en tubos con fluoruro de sodio (anticoagulante). Las muestras se centrifugaron inmediatamente por 10 min a una velocidad de 1500 x g, y se separó el suero o el plasma, los que se almacenaron a -20°C hasta las respectivas mediciones.

## **Comportamientos**

A partir de los videos se registraron la frecuencia de aparición de olfateos, inmovilizaciones, intentos de escape, líneas divisorias cruzadas, vocalizaciones y eliminaciones (orina + defecación). Además, se determinó la latencia a la primera vocalización, eliminación, y el tiempo de permanencia en los cuadrantes de la periferia.

## **Frecuencia cardiaca**

Se registró la FC de forma continua con un polar (Transmisor codificado Polar Equine T54H con un monitor RS400), que se colocó en las ovejas en el tiempo -5 y se retiró 15 minutos después del test. Se determinaron las FCs antes del TAS, máxima al TAS, luego del TAS, y el tiempo en volver a la FC antes del test, utilizando el software Polar Pro Trainer 5.

## **Frecuencia respiratoria y temperaturas**

Se midió la temperatura rectal con un termómetro digital, y las temperaturas superficiales (en las zonas cardiaca, pared abdominal y perineo) con un termómetro laser (IR-102 Infrared Thermometer, Super Elec. Equip. Co, China) a los -5, 0, 10, 20, 30 y 45 min. Se registró la FR por conteo de los movimientos torácicos durante 30 segundos, en los mismos tiempos que las temperaturas.

## **Progesterona sérica**

En las muestras de los Días -11 y -2 se cuantificó la concentración de P4, confirmando que ninguna borrega estaba ciclando. Se determinó la concentración de P4 sérica para todas las muestras de suero colectadas de las 5 borregas para caracterización de la curva de P4 durante el tratamiento con CIDR y luego de la retirada del mismo. Se midió la P4 sérica en los grupos en las muestras de suero de los grupos E2-SP4 y E2-C colectadas en los tiempos -5, 0 y 30 min (Figura 15). Se determinó la P4 sérica en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, California, estados Unidos). La sensibilidad analítica del ensayo fue de 0,25 nmol/L, y el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 10,7%.

## **Cortisol sérico**

Se determinó la concentración de cortisol sérico en las muestras colectadas antes del TAS y en todos los tiempos posteriores (Figura 15), en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Se utilizó un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, Los Angeles, CA, EUA). La sensibilidad analítica del ensayo fue 19,04 nmol/L. El coeficiente de variación intra-ensayo estuvo por debajo de 11,7%.

## **Glucemia**

Se determinó la glucemia de las muestras de plasma colectadas en los tiempos -5, 0, 30 y 60 min (Figura 15) en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad

de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (11504, BioSystems, Barcelona, España).

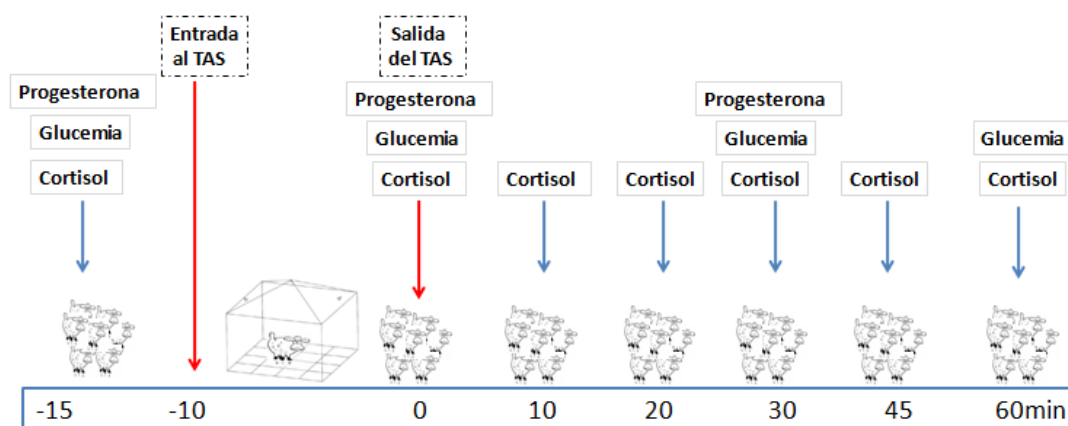


Figura 15. Esquema de muestreo realizado: tiempos de determinación de progesterona, glucemia y cortisol en relación al test de aislamiento social.

#### 4.2.5. Análisis estadístico

Se compararon las concentraciones séricas de P4 y cortisol, la glucemia, la FR, la FC y las temperaturas registradas para los tiempos -5 y 0 (para comparar la variación al TAS) y en todos los tiempos al TAS para las mismas variables (excepto para FC), con ANOVA para mediciones repetidas, utilizando el modelo mixto del SAS (2003; SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EUA). El modelo consideró como efectos fijos el tratamiento (E2-SP4 vs. E2-C), el tiempo, y la interacción entre tratamiento y tiempo, y la borrega de cada grupo como un efecto al azar. Se incluyeron en el modelo como covariables los datos del tiempo antes de entrar al TAS (tiempo -5) para cada oveja y el día en que se hizo el TAS (primer o segundo día en que se realizó el TAS). Las comparaciones pos-hoc se realizaron con LSD.

Se calculó el área bajo la curva de cortisol de cada borrega. Se compararon entre grupos los parámetros analizados de FC, el área bajo la curva de cortisol y los comportamientos registrados durante el TAS que presentaron distribución normal por ANOVA. Los intentos de escape y eliminaciones fueron comparados por test U de Mann-Whitney. Además, se compararon los tiempos a la primera vocalización y eliminación con una prueba de sobrevivencia utilizando el SAS.

#### 4.2.6. Resultados

##### Perfil de progesterona sérica durante el tratamiento y luego de la suspensión del mismo

El perfil de concentración de P4 sérica de las 5 borregas durante el tratamiento con CIDR y luego de la suspensión del mismo se muestra en la Figura 16. La concentración de P4 alcanzó un pico en los 1-4 días, manteniéndose en niveles luteales durante los 13 días de tratamiento, alcanzando niveles basales a las 4 h de retirados los dispositivos intravaginales.

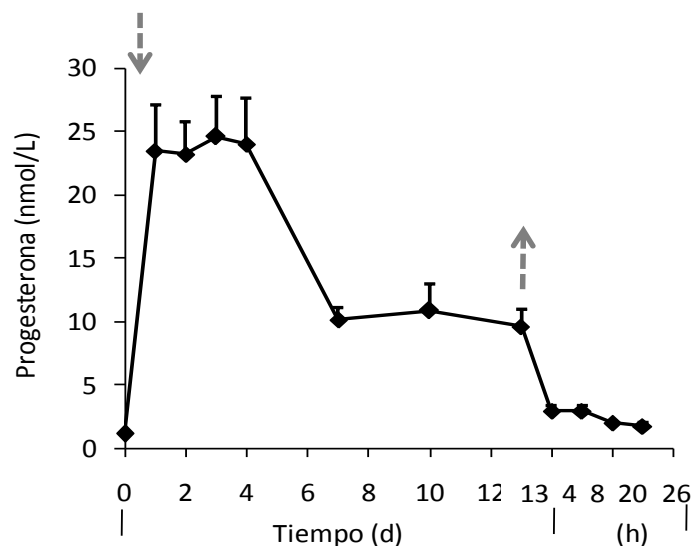


Figura 16. Perfil de concentración de progesterona sérica de las 5 borregas durante el tratamiento con CIDR y luego de la suspensión del mismo. La flecha puntillada hacia abajo y hacia arriba representan los días en que se insertaron y se retiraron los CIDRs respectivamente.

### Comportamientos

Los grupos E2-SP4 y E2-SP4C no presentaron diferencias en ninguno de los comportamientos registrados durante el TAS (Cuadro II).

Cuadro II. Comportamiento de borregas durante el test de aislamiento social (media  $\pm$  EE). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días, el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento.

| Actividades                            | E2-SP4         | E2- SP4C       |
|--|----------------|----------------|
| Nº total de divisiones cruzadas        | 56,3 $\pm$ 6,7 | 53,4 $\pm$ 4,4 |
| Nº de cruces de la periferia           | 36,8 $\pm$ 4,1 | 41,1 $\pm$ 2,9 |
| Nº de olfateos                         | 20,9 $\pm$ 3,0 | 23,1 $\pm$ 3,6 |
| Nº de intentos de escape               | 0,2 $\pm$ 0,1  | 2,4 $\pm$ 2,2  |
| Nº de inmovilizaciones                 | 31,9 $\pm$ 4,3 | 32,1 $\pm$ 2,5 |
| Nº de eliminaciones                    | 0,7 $\pm$ 0,1  | 0,4 $\pm$ 0,2  |
| Nº de vocalizaciones                   | 27,4 $\pm$ 6,6 | 31,7 $\pm$ 7,6 |
| Tiempo en la periferia (min)           | 7,2 $\pm$ 0,6  | 7,9 $\pm$ 0,5  |
| Tiempo a la primera eliminación (min)  | 4,2 $\pm$ 1,5  | 6,9 $\pm$ 1,4  |
| Tiempo a la primera vocalización (min) | 2,5 $\pm$ 1,3  | 3,3 $\pm$ 1,2  |

Las variables fisiológicas (concentraciones de P4 y de cortisol, glucemia, FR y temperaturas) registradas al TAS no presentaron diferencias debidas al tratamiento, ni interacción entre tratamiento y tiempo. Tampoco hubo diferencias entre grupos o interacción en la variación al TAS (tiempos -5 y 0) para concentración de P4, glucemia, FR, FC y temperaturas.

### Frecuencia cardiaca

Las borregas E2-SP4 y E2-SP4C no presentaron diferencias significativas en la FC máxima durante el TAS, ni en el tiempo para volver a la FC observada antes del test (Cuadro III).

Cuadro III. Frecuencia cardiaca (latidos/min; media  $\pm$  EE) de borregas sometidas al test de aislamiento social luego de la suspensión del tratamiento con progesterona. Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días, el que fue retirado 24 h antes del test; las borregas E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento.

| <b>Frecuencia Cardiaca</b>                     | <b>E2-SP4</b>   | <b>E2- SP4C</b>  |
|--|-----------------|------------------|
| Antes del TAS                                  | 116,8 $\pm$ 5,4 | 120 $\pm$ 9,7    |
| Máxima en el TAS                               | 222,7 $\pm$ 3,4 | 226,4 $\pm$ 2,2  |
| Luego del TAS                                  | 203,7 $\pm$ 7,2 | 202,8 $\pm$ 28,9 |
| Tiempo para volver a la FC antes del TAS (min) | 18,5 $\pm$ 1,7  | 19,8 $\pm$ 1,9   |

### Frecuencia respiratoria

La FR aumentó luego del TAS ( $P < 0,0001$ ), y a los 10 min volvió a los valores iniciales (Figura 17).

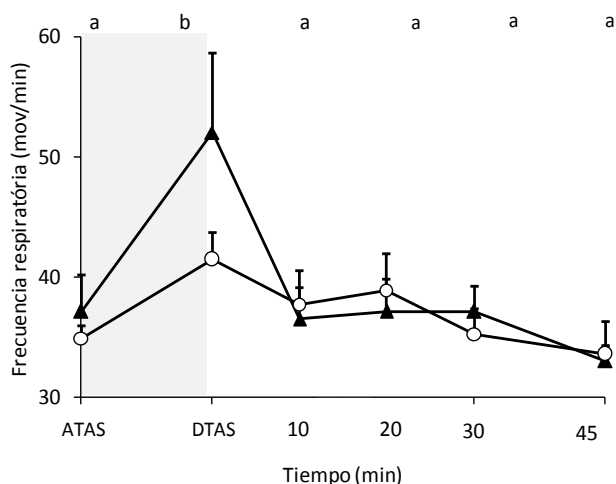


Figura 17. Frecuencia respiratoria (movimientos/min) en borregas (media  $\pm$  SEM) antes y luego del test de aislamiento social (área sombreada). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días (-▲-), el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento (-○-). ATAS: cinco min antes del test de aislamiento social; DTAS: después del test de aislamiento social. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ( $P < 0,0001$ ).

## Temperaturas

Las temperaturas de la zona perineal, abdominal, cardíaca y rectal aumentaron luego del TAS ( $P < 0,03$ ; Figura 18 A a D).

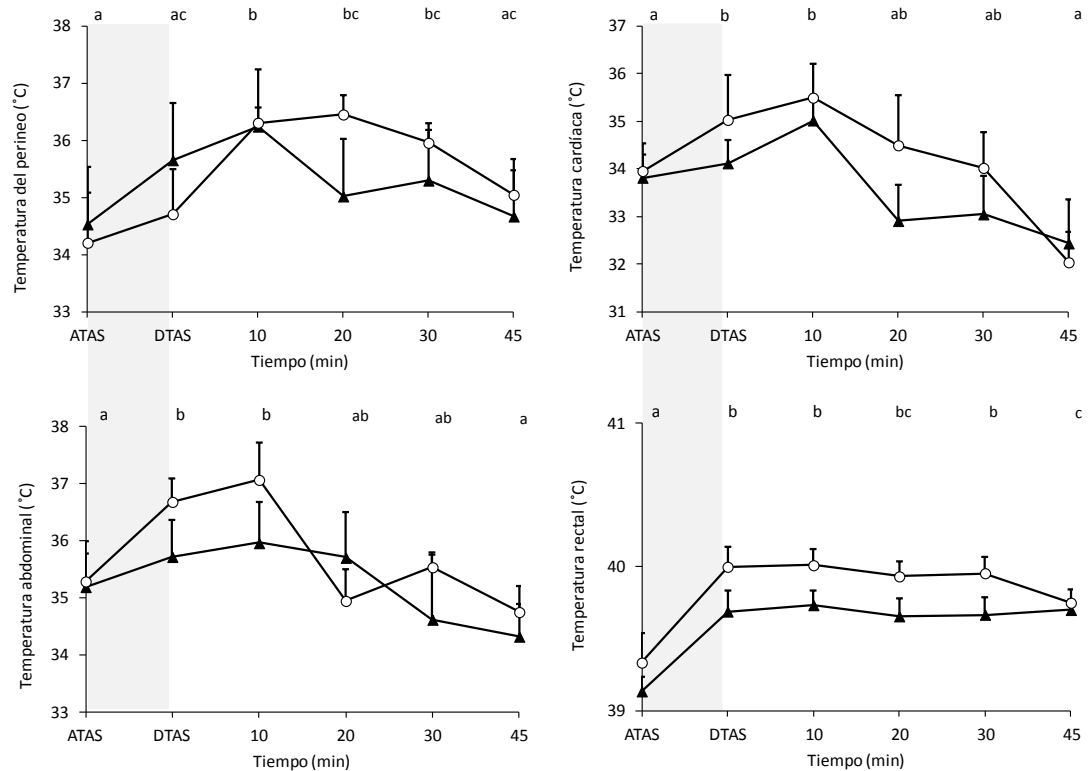


Figura 18. Temperaturas de la zona perineal (A); abdomen (B); cardíaca (C); y rectal (D) (media  $\pm$  EE) antes y luego del test de aislamiento social (área sombreada). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días (- $\blacktriangle$ -), el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento (- $\circ$ -). ATAS: cinco min antes del test de aislamiento social; DTAS: después del test de aislamiento social. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ( $P < 0,03$ ).

## Progesterona sérica

La concentración de P4 sérica se elevó luego del TAS en las borregas E2-SP4 y E2-SP4C ( $P < 0,0004$ ), y no volvió a valores iniciales a los 30 min (Figura 19).



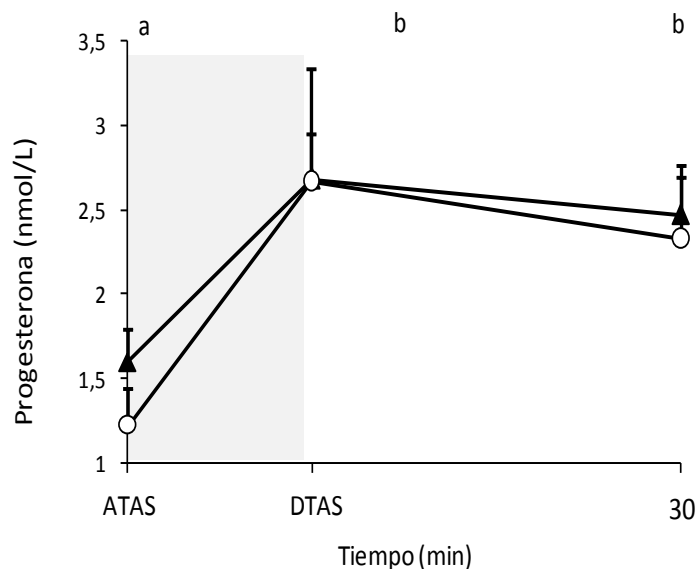


Figura 19. Concentración de progesterona sérica en borregas (media  $\pm$  EE) antes y luego del test de aislamiento social (área sombreada). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días (-▲-), el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento (-○-). ATAS: cinco min antes del test de aislamiento social; DTAS: después del test de aislamiento social. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ( $P < 0,0004$ ).

### Cortisol sérico

La concentración de cortisol aumentó luego del TAS de manera similar en ambos grupos ( $P < 0,0001$ ; Figura 20), no llegando a las concentraciones basales a los 60 min. Las borregas E2-SP4 tendieron a variar más la concentración de cortisol antes y después del TAS ( $P = 0,07$ ). Además, tendieron a tener una mayor área bajo la curva que las ovejas E2-SP4C ( $9612,3 \pm 839,1$  vs  $8093,3 \pm 627,9$  nmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;  $P = 0,08$ ).

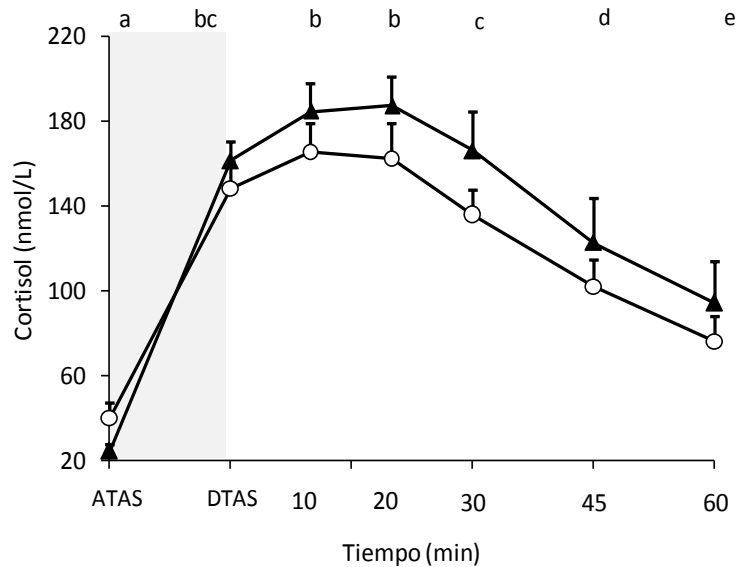


Figura 20. Concentración de cortisol sérico en borregas (media  $\pm$  EE) antes y luego del test de aislamiento social (área sombreada). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días (-▲-), el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento (-○-). ATAS: cinco min antes del test de aislamiento social; DTAS: después del test de aislamiento social. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ( $P < 0,0001$ ).

### Glucemia

La glucemia aumentó luego del TAS ( $P < 0,0001$ ), volviendo a los 60 min a los valores iniciales (Figura 21).

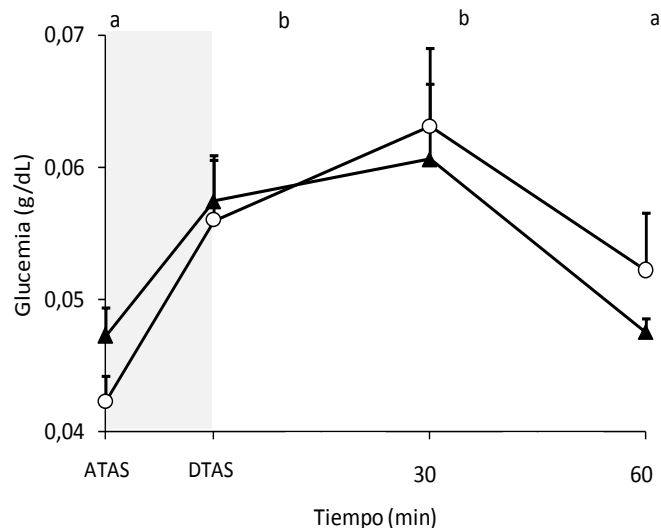


Figura 21. Glucemia en borregas (media  $\pm$  EE) antes y luego del test de aislamiento social (área sombreada). Las borregas E2-SP4 fueron tratadas con un CIDR durante 13 días (-▲-), el que fue retirado 24 h antes del test; E2-SP4C no recibieron ningún tratamiento (-○-). ATAS: 5 min antes del test de aislamiento social; DTAS: después del test de aislamiento social. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ( $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.7. Discusión

A partir de los procedimientos experimentales realizados y de las respuestas comportamentales y fisiológicas registradas al TAS, no pudimos confirmar nuestra hipótesis, aunque encontramos indicios en la dirección de la misma. En este sentido, las tendencias a que las ovejas tratadas tuvieran mayor cambio en la concentración de cortisol en el TAS y a una mayor superficie bajo la curva, lo que refleja la secreción total de cortisol, permite especular con que la respuesta de estrés al TAS podría ser mayor debida a la suspensión del tratamiento con P4. Al menos dos factores, el tiempo transcurrido entre la finalización del tratamiento con P4 y la realización del TAS, y la magnitud de las respuestas indicadoras de estrés antes del inicio del TAS podrían haber enmascarado las diferencias entre grupos.

El tiempo entre la remoción del tratamiento con P4 y la introducción de los animales en los tests de estrés o ansiedad podría ser un factor determinante en la magnitud de las respuestas a estos estresores. En nuestro estudio sometimos a las borregas al TAS 24 h de retirado los CIDRs, momento en que las concentraciones de P4 ya estaban en niveles basales por alrededor de 20 h. En este sentido, en un estudio posterior a este en que utilizamos CIDRs en terneras como forma de tratamiento de P4 encontramos que a las 16 h de retirado los mismos hubo una mayor reactividad al manejo humano que en terneras sin tratamiento hormonal (Magri et al. 2013). Considerando este estudio, sería interesante someter a las borregas a un ambiente novedoso (TAS) antes de las 24 h de retirados los dispositivos intravaginales para determinar si en ese caso la respuesta de estrés es mayor. Si bien en trabajos realizados en roedores se encontró mayor ansiedad o respuesta de estrés al realizar los tests a las 24 h de la última inyección o de removido los implantes de P4 (Smith et al. 2004; Smith et al. 2007), el tipo de test y especie utilizada pueden condicionar el tiempo que debe transcurrir entre la suspensión del tratamiento con P4 y el desafío estresante (Starkey y Bridges, 2010; Gulinello & Smith 2003; Beckley & Finn (2007).

El estado fisiológico de las borregas antes de iniciarse el TAS podría haber enmascarado diferencias entre los grupos. Los valores de FR y FC antes de que los animales fueran sometidos al TAS eran al menos 45% más elevados que los basales normales para la especie. Asimismo, las concentraciones séricas de P4 y cortisol, y la FR no alcanzaron los niveles basales o iniciales antes de finalizar los registros. A su vez, las respuestas al TAS fueron mayores a las esperadas, lo que permite especular que los animales ya tenían un nivel de estrés importante antes de entrar al TAS, lo que podría haber impedido observar diferencias entre grupos. Para eso es necesario considerar que los animales fueron sometidos a un manejo inhabitual (manipulación, sangrados y cambios de encierros). También, si bien no fue determinado mediante ningún test (Dodd et al, 2012), las borregas demostraban tener un temperamento nervioso, lo que es esperable con animales habituados al manejo de campo extensivo. De todas formas es interesante que la intensidad de la respuesta permitió detectar aumentos en la concentración de P4 provocados por el TAS. En este sentido, Dobson et al. (1999) encontraron que el transporte provoca un aumento en la concentración sérica de P4 en ovejas en anestro. En síntesis, las borregas ya demostraban un nivel de estrés inicial importante lo que podría haber impedido detectar diferencias entre los tratamientos.

En conclusión, encontramos indicios de que la disminución de la concentración de P4 generaría una mayor respuesta de estrés al TAS en ovejas en anestro, sin embargo más trabajos son necesarios para obtener conclusiones definitivas.

## **5. DISCUSIÓN GENERAL**

Al estudiar los efectos del tratamiento con P4 y de la suspensión del mismo sobre la respuesta de estrés de ovejas en anestro frente a dos situaciones estresantes (destete y TAS), se obtuvieron diferencias claras entre grupos dadas por el tratamiento de P4 sobre la respuesta de estrés al destete; sin embargo, no se obtuvo una diferencia clara en la respuesta al TAS luego de la suspensión del tratamiento con P4. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demostraron que el tratamiento con P4 reduce la respuesta de estrés o ansiedad en roedores (Barbaccia et al. 2001). Es posible que para determinar diferencias debidas a la suspensión del tratamiento con P4 sea necesario detectar cual es el momento más adecuado entre retirada del tratamiento y aplicación del estresor.

Las ovejas tratadas con P4 presentaron menores respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés al destete. Además, de acuerdo con nuestro conocimiento esta fue la primera caracterización completa de las respuestas comportamentales de las ovejas al destete. De manera general, tanto la respuesta comportamental como la fisiológica fueron generadoras de un importante costo energético. Relacionado a eso, el tratamiento con P4 puede mejorar las condiciones de salud de las ovejas luego del destete, pudiendo reducir la susceptibilidad a enfermedades. Además, el hecho de que la P4 no tuvo efectos en la producción y composición de la leche, peso de los corderos y comportamiento de amamantamiento indican que las diferencias en la respuesta de estrés no fue consecuencia de un adelantamiento del proceso de destete natural debido a una reducción de la producción de leche. Al mismo tiempo, que el tratamiento con P4 en niveles lutelaes no haya afectado la producción y composición de leche, demuestra que este tratamiento puede ser utilizado en ovejas lecheras para inducir o sincronizar celos sin pérdidas en la producción lechera.

A partir de las respuestas comportamentales y fisiológicas registrados al TAS, no pudimos confirmar que la suspensión del tratamiento con P4 genera mayor respuesta de estrés en borregas sometidas al TAS, sin embargo, encontramos indicios en dirección a esta hipótesis. Por eso, si bien es una especulación, es posible que factores como el tiempo entre la remoción del tratamiento con P4 y la realización del TAS, y la intensidad de las respuestas de los animales puedan haber enmascarado posibles efectos del tratamiento. El momento adecuado para introducir los animales en los tests de estrés o ansiedad luego de la remoción tratamiento con P4 parece ser un factor determinante en sus respuestas a estos estresores. El tipo de test y especie utilizada también parecen ser factores a considerar para determinar el momento para someter a los animales en los tests de estrés o ansiedad luego de suspender el tratamiento con P4. Además, el manejo inhabitual que se sometieron las borregas, bien como su temperamento, posiblemente generó una respuesta de estrés maximizada al TAS.

En este trabajo se demostraron los efectos protectores de la P4 frente a la respuesta de estrés en ovejas, aunque el período largo del tiempo de tratamiento puede tornar difícil su aplicación práctica. Por ello sería interesante testar la efectividad de tratamientos cortos, o incluso de una inyección única de P4 anterior a la situación estresante. También, se encontraron indicios de que la disminución de la concentración de P4 genera una mayor respuesta de estrés frente a una situación

estresante. Además de proponer testar esta hipótesis en diferentes tiempos entre la finalización del tratamiento con P4 y la situación estresante, sería interesante normalizar el estresor utilizado para evitar posibles diferencias de acuerdo a la percepción individual de los animales. En este sentido, una alternativa inicial para continuar evaluando el punto sería determinar la respuesta frente a un desafío con ACTH.

## **6. CONCLUSIONES GENERALES**

A partir de esta Tesis se concluyó que:

- ✓ El tratamiento con P4 redujo las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés al destete en ovejas en anestro.
- ✓ Encontramos indicios de que la disminución de la concentración de P4 generaría una mayor respuesta de estrés al TAS en ovejas en anestro.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Ainsworth L, Downey BR. (1986). A controlled internal drug-release dispenser containing progesterone for control of the estrous cycle of ewes. *Theriogenology* 26: 847-856.

Al-Qarawi AA, Badreldin HA. (2005). Isolation stress in desert sheep and goats and the influence of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Vet res commun* 29:81-90.

Allison RW. (2012). Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. En: Thrall MA. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Ed. Blackwell Publishing 2<sup>a</sup> ed. Oxford, pp.460-475.

Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. (2007). Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors. *Pharmacol Therapeut* 116:35-57.

Apple JK, Minton JE, Parsons KM, Unruh JA. (1993). Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *Journ of Anim Sci* 71:71-77.

Archer J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21: 205-235.

Arnold GW, Wallace SR, Maller RA. (1979). Some factors involved in natural weaning processes in sheep. *Appl Anim Ethol* 5:43-50.

Arroyo J, Magana-Sevilla H, Camacho-Escobar MA. (2009). Neuroendocrine regulation of postpartum anestrous in ewes. *Trop subtrop agroecosys*, 10:301-312.

Auger CJ, Forbes-Lorman RM. (2008). Progesterin receptor-mediated reduction of anxiety-like behavior in male rats. *Plos One* 3:1-6.

Barbaccia ML, Concas A, Serra M, Biggio G. (1998). Stress and neurosteroids in adult and aged rats. *Exp Gerontol* 33:697-712.

Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G. (2001). Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol* 46:243-272.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113:275-285.

Bartlewski PM, Beari AP, Rawlings NC. (1999). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52:115-130.

Bath GF. (1998). Management of pain in production animals. *Appl Anim Behav Sci* 59:147-156.



Beckley EH, Finn DA. (2007). Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol Biochem Be* 87:412-419.

Berger, J. (1979). Weaning conflict in desert and mountain bighorn sheep (*ovis canadensis*): an ecological interpretation. *Z Tierpsychol* 50: 188-200.

Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK. (1993). Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA<sub>A</sub> receptor function. *Pharmacol Biochem Be* 45:423-428.

Bitran D, Shiekh M, McLeod M. (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Neuroendocrinology* 3:171-177.

Blaustein JD. (2008). Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annu Rev Psychol* 59:93-118.

Bouissou MF, Vandenheede M. (1995). Fear reactions of domestic sheep confronted with either a human or a human-like model. *Behav Proc* 34:81-92.

Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: Form and function in brain. (2008). *Front Neuroendocrin* 29:313-339.

Brunton PJ, Russell JA. (2010). Endocrine induced changes in brain function during pregnancy. *Brain Res* 1364:198-215.

Brunton PJ, McKay AJ, Ochedalski T, Piastowska A, Rebas E, Lachowicz A and Russell JA 2009. Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is Induced by the neurosteroid allopregnanolone. *J Neurosci* 29:6449-6460.

Buck KJ, McQuilkin SJ, Harris RA. (1991). Modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor-operated chloride channels by benzodiazepine inverse agonists is related to genetic differences in ethanol withdrawal seizure severity. *J Neurochem* 57:2100-2105.

Bullock AE, Clark AL, Grady SR, Robinson SF, Slobe BS, Marks MJ, Collins AC. (1997) Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem* 68: 2412-2423.

Busch S D, Hayward LS. (2009). Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biol Conserv* 142:2844-2853.

Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS. (2008). Vasopressin: Behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog Neurobiol* 84:1-24.

Compagnone NA, Mellon SH. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21:1-56.

Cannon WB. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9: 399-431.

Carrasco GA, Van de Kar LD. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463:235-272.

Cockram MS, Imlah P, Goddard PJ, Harkiss GD, Waran NK. (1993). The behavioural, endocrine and leucocyte response of ewes to repeated removal of lambs before the age of natural weaning. *Appl Anim Behav Sci* 38:127-142.

Corpechot C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VV, Banner C, Sjoval J. (1993). Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alphapregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133:1003-1009.

Crossley KJ, Walker DW, Beart PM, Hirst JJ. (2000). Characterization of GABAA receptors in fetal, neonatal and adult ovine brain: region and age related changes and the effects of allopregnanolone. *Neuropharmacology* 39:1514-1522.

Crossley KJ, David IN, Walker W, Lawrence AJ, Beart PM, Hirst JJ. (2003). Steroid-sensitive GABAA receptors in the fetal sheep brain. *Neuropharmacology* 45:461-472.

Cunningham JC, Bradley KG. (2008). *Tratado de fisiologia veterinária*. Ed. Elsevier 4ª ed. Rio de Janeiro.

da Costa AP, Leigh AE, Man MS, Kendrick KM. (2004). Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *Proc R Soc Lond* 271:2077-2084.

Damián JP, Ungerfeld R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod Dom Anim* 46: 646-650.

Damián Cabrera JP. (2011). *Estrés y jerarquía social en carneros: respuestas bioquímicas, fisiológicas y comportamentales a diferentes estresores*. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.

Dodd CL, Pitchford WS, Edwards JEH, Hazel SJ. (2012). Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A review. *Appl Anim Behav Sci* 140:1-15.

Doney JM, Peart JN, Smith WF, Louda F. (1979). A consideration of the technique for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *J Agr Sci* 92:123-132.

- Ducharme N, Banks WA, Morley JE, Robinson SM, Niehoff ML, Mattern C. (2010) Brain distribution and behavioral effects of progesterone and pregnenolone after intranasal or intravenous administration. *Eur J Pharmacol* 641:128-134.
- Earley B, Buckham-Sporer K, Gupta S, Pang W, Ting S. (2010). Biologic response of animals to husbandry stress with implications for biomedical models. *Anim Physiol* 2:25-42.
- Earley B, McDonnell B, Murray M, Prendiville DJ, Crowe MA. (2011). The effect of sea transport from Ireland to the Lebanon on inflammatory, adrenocortical, metabolic and behavioural responses of bulls. *Res in Vet Sci* 91:454-464.
- Eggleston DL, Wilken C, Van Kirk EA, Slaughter RG, Ji TH, Murdoch WJ. (1990). Progesterone induces expression on endometrial messenger RNA encoding for cyclooxygenase (Sheep). *Prostaglandins* 39:675-683.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. (2004). The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrin* 25:132-149.
- Ferreira A, Carrau A, Rodas E, Rubianes E, Benech A. (1992). Diazepam facilitates acceptance of alien lambs by postparturient ewes. *Physiol Behav* 5:1117-1121.
- Flower F, Weary D. (2001). Effects of early separation on the dairy cow and calf. II: Separation at 1 day and 2 weeks after birth. *Appl Anim Behav Sci* 70: 275-284.
- Forkman B, Boissy A, Meunier-Salaün MC, Canali E, Jones RB. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol Behav* 92: 340-374.
- Gallo MA, Smith SS. (1993). Progesterone Withdrawal Decreases Latency to and Increases Duration of Electrified Prod Burial: A Possible Rat Model of PMS Anxiety. *Pharmacol Biochem Be* 46:897-904.
- Galyean ML, Lee RW, Hubbert ME. (1981). Influence of fasting and transit on ruminal and blood metabolites in beef steers. *J anim sci* 53:7-18.
- Gomez C, Saldivar-Gonzalez A, Delgado G, Rodriguez R. (2002). Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Be* 72:543-550.
- Goodman RL, Inskeep EK. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Neill JD. *Physiology of reproduction*. Ed. Elsevier 3<sup>a</sup> ed. St. Louis, pp. 2389-2448.
- Griffin JFT. (1989). Stress and Immunity: a Unifying Concept. *Vet Immunol Immunop* 20: 263-312.
- Gulinello M, Smith SS. (2003). Anxiogenic Effects of Neurosteroid Exposure: Sex Differences and Altered GABAA Receptor Pharmacology in Adult Rats. *J pharmacol exp therap.* 305:541-548.

Hall CS. (1934). Emotional behavior in the rat: I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18: 385-403.

Hamra AH, Massri YG, Marcek JM, Wheaton JE. (1986). Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled internal drug-release dispensers, implants and sponges. *Anim Reprod Sci* 11:187-194.

Hassell J, Miryalac CSJ, Hiegeld C, L Uphouse (2011). Mechanisms responsible for progesterone's protection against lordosis-inhibiting effects of restraint i. role of progesterone receptors. *Horm Behav* 60:219-225.

Hearly PJ, Falk RH 1974. Values of some biochemical constituents in the serum of clinically normal sheep. *Aust Vet J* 50:302-305.

Heinsbroek RPW, Haaren FV, De Poll Nev. (1988) Effects of Progesterone on Open Field Behavior of Food Deprived Ovariectomized Female Rats. *Physiol Behav* 43:779-782.

Hinch GN, Lecrivain E, Lynch JJ, Elwin RL. (1987). changes in maternal-young associations with increasing age of lambs. *Appl Anim Behav Sci* 17: 305-318.

Hunter MG. (1991). Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil* 43:91-99.

Jiang P, Yang CX, Wang YT, TL Xu. (2006). Mechanisms of modulation of pregnanolone on glycinergic response in cultured spinal dorsal horn neurons of rat. *Neuroscience* 141: 2041-2050.

Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav R* 16:115-130.

Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. (1993). Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132:249-254.

Karavolas HJ, Hodges DR. (1991). Metabolism of progesterone and related steroids by neural and neuroendocrine structures. En: Costa E, Paul SM. *Neurosteroids and brain function*. Ed. Thieme Medical Publishers 1<sup>a</sup> ed. New York, pp. 135-145.

Kaura V, Ingram CD, Gartside SE, Young AH, Judge SJ. (2007). The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABAA receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *Eur Neuropsychopharm* 17:108-115.

King SR. (2012). *Neurosteroids and the nervous system*. Ed. Springer 1<sup>a</sup> ed. New York.

Koolhaasa JM, Bartolomuccic A, Buwaldaa B, Boera SF, Flüggel G, Kortei SM, Meerloa P, Murisong R, Olivier B, Palanzak P, Richter-Levine G, Sgoifok A, Steimerj T, Stiedl O, van Dijkh G, Wöhrd M, Fuchs E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci and Biobehav Rev* 35:1291-1301.

- Kudielka BM, C Kirschbaum. (2007). Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69:113-132.
- Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RDJ, Weir CJ, Belelli D. (2009). Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34: 48-58.
- Legan SJ, Karsch FJ. (1980). Photoperiodic Control of Seasonal Breeding in Ewes: Modulation of the Negative Feedback Action of Estradiol. *Biol of Reprod* 23:1061-1068.
- Legan SJ, Winans SS. (1981). The Photoneuroendocrine Control of Seasonal Breeding in the Ewe. *Gen comp endocr* 45, 317-328.
- Lehner PN. (1996). Handbook of ethological methods. Ed. Cambridge University Press 2<sup>a</sup> ed. Cambridge.
- Löfgren M, Inga-Maj J, Bengt M, Per L, Torbjörn B. (2006). Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav* 50:208-215.
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Turkmen S, Bäckström T. (2009). Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. *Physiol Behav* 96:91-97.
- Lösel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83: 965-1016.
- Lynch JJ, Hinch GN, Adams DB. (1992). The behaviour of sheep: Biological principles and implications for production. Ed. CSIRO 1<sup>a</sup> ed. Melbourne.
- Magri G, Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R. (2013). Changes in progesterone concentration affects results of temperament assessment in beef calves. *Enviado*.
- Malpoux B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Neill JD. Control of ovulation. Ed. Elsevier 3<sup>a</sup> ed. San Diego, pp. 2231-2281.
- Manalu W, Sumaryadi MY, Sudjatmogo, Satyaningtijas AS. (2000). Effect of superovulation prior to mating on milk production performance during lactation in ewes. *J Dairy Sci* 83:477-483.
- Mandiki SNM, Fossion M, Paquay R. (1989). Daily variations in suckling behaviour and relationship between suckling intensity and lactation anestrus in Texel ewes. *Appl Anim Behav Sci* 29:247-255.
- Maniam J, Morris MJ. (2012). The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63:97-110.

- Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ. (2000). Neuroendocrine responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Ed. CABI Publishing 2<sup>a</sup> ed. Cambridge, pp. 43-76.
- Martin, G.B. (1984). Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Rev* 59:1-87.
- McCaslin PP, Morgan WM. (1988). Anticonvulsive activity of several excitatory amino acid antagonists against barbital withdrawal-induced spontaneous convulsions. *Eur J Pharmacol* 147:381-386.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Phys Rev* 79:263-324.
- McEwen BS. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Tips* 12: 141-147.
- McEwen BS, Wingfield JC. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43:2-15.
- McKusick BC, Wiltbank MC, Sartori R, Marnet PG and Thomas DL. (2002). Effect of presence or absence of corpora lutea on milk production in East Friesian dairy ewes. *J Dairy Sci* 85:790-796.
- Meidan R, Milvae RA, Weiss S, Levy N, Friedman A. (1999). Intra-ovarian regulation of luteolysis. *J Reprod Fertil Suppl* 54:217-228.
- Miryala CSJ, Hassell J, Adams S, Hiegel C, Uzor N, Uphouse L. (2011). Mechanisms responsible for progesterone's protection against lordosis-inhibiting effects of restraint II. Role of progesterone metabolites. *Horm Behav* 60: 226-232.
- Moberg GP. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. En: MobergGP, Mench JA. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Ed. CABI Publishing 1<sup>a</sup> ed, Oxon, pp. 1–22.
- Möstl E, Palme R.(2002). Hormones as indicators of stress. *Dom Anim Endocrinol* 23:67-74.
- Napolitano F, Marino V, De Rosa G, Capparelli R, Bordi A. (1995). Influence of artificial rearing on behavioral and immune response of lambs. *Appl Anim Behav Sci* 45:245-253.
- Napolitano F, Rosa D, Sevi A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 110:58-72.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, EW McIntush. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80:1-29.

Olsen RW, Tobin AJ. (1990). Molecular biology of GABA receptors. *Faseb J* 4:1469-1480.

Orgeur P, Mavric N, Yvone P, Bernard S, Nowak R, Schaal B, Levy F. (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and immunopathological indicators of welfare. *Appl Anim Behav Sci* 58:87-103.

Orgeur P, Bernard S, Naciri M, Nowak R, Schaal B, Levy F. (1999). Psychological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39:231-244.

Orihuela A, Sánchez-Mejorada H, Toledo M. (2002). Effect of short transport during di-oestrus and prooestrus on cortisol levels and oestrous behaviour of sheep. *J Agr Sci* 138:93-96.

Pacák K, Palkovits M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22: 502-548.

Pacák K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275: 1247-1255

Parrott RF, Thornton SN, Forsling ML, Delaney CE. (1987). Endocrine and behavioural factors affecting water balance in sheep subjected to isolation stress. *J Endocrinol* 12: 305-310.

Patchev VK, Shoaib M, Holsboer F, Almeida OFX. (1994). The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 62:265-271.

Patchev VK, Hassan AH, Holsboer DF, Almeida OF. (1996). The neurosteroid tetrahydroprogesterone attenuates the endocrine response to stress and exerts glucocorticoid-like effects on vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacol* 5:533-540.

Paul SM, Purdy RH. (1992). Neuroactive steroids. *Faseb J* 6:2311-2322.

Pedernera-Romano C, Ruiz de la Torre JL, Badiella L, Manteca X. (2010). Effect of perphenazine enanthate on open-field test behaviour and stress-induced hyperthermia in domestic sheep. *Pharmacol Biochem Be* 3:329-32.

Pérez-León I, Orihuela A, Lidfors L, Aguirre V. (2006). Reducing mother young separation distress by inducing ewes into oestrous into day of weaning. *Anim Welf* 15: 383-389.

Piccinato CA. (2008). Regulation of steroid metabolism and the hepatic transcriptome by estradiol and progesterone. Tesis de doctorado, University of Wisconsin Madison, Madison, Estados Unidos.

Pluchino N, Cubeddu A, Giannini A, Merlini S, Cela V, Angioni S, Genazzani AR. (2009). Progesterone and brain: An update. *Maturitas* 62:349-355.

Poindron P, Levy F, Keller M. (2006). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol* 49:54-70.

Purdy RH, Morrow AL, Moore Jr. PH, Paul SM. (1991). Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 88:4553-4557.

Rawlings NC, Bartlewski PM. (2007). Reproductive physiology of ewes. En: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. Ed. Elsevier 2<sup>a</sup> ed. St. Louis, pp. 642-649.

Reddy DS, O'Malley BW, Rogawski MA. (2005). Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 48:14-24.

Romeyer A, Bouissou M. (1992). Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Appl Anim Behav Sci* 34:93-119.

Rosa HJD, Bryant MJ. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum Res* 48:155-171.

Rubianes E, Ungerfeld R. (1993). Uterine involution and ovarian changes during early post partum in autumn-lambing Corriedale ewes. *Theriogenology* 40:365-372.

Rubianes E, Ungerfeld R. (2002). Reinicio de la actividad cíclica durante el postparto de la oveja. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los animales domésticos*. Ed. Melibea 1<sup>a</sup> ed. Montevideo, pp. 223-240.

Rupprecht R, Hauser CAE, Trapp T, Holsboer F. (1996). Neurosteroids: molecular mechanisms action and psychopharmacological significance. *Steroid Biochem Molec Biol* 56: 163-168.

Sabban EL. (2010). Catecholamines and stress. En: Soreq H, Friedman A, Kaufer D. *Stress: from molecules to behavior: a comprehensive analysis of the neurobiology of stress responses*. Ed. Wiley Blackweel 1<sup>a</sup> ed. Weinheim, pp. 19-36.

Säkkinen H, Tverdal A, Eloranta E, Dahl E, Holand Ø, Saarela S and Ropstad E. (2005). Variation of plasma protein parameters in four free-ranging reindeer herds and in aptive reindeer under defined feeding conditions. *Comp Biochem Physiol* 142:503-511.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000). How do glucocorticoids influence stress response? Integration of permissive, suppressive stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev* 2:55-89.

Sapolsky RM. (2004). Social status and health in humans and other animals. *Annu Rev Anthropol* 33: 393-418.



Schirar A, Cognie Y, Louault F, Poulin N, Levasseur MC, Martinet J. (1989). Resumption of oestrous behaviour and cyclic ovarian activity in suckling and non-suckling ewes. *J Reprod Fertil* 87:789-794.

Schirar A, Cognié Y, Louault F, Poulin N, Meusnier C, Levasseur MC, Martinet J. (1990). Resumption of gonadotropin release during the post-partum period in suckling and non-suckling ewes. *J Reprod Fertil* 88:593-604.

Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res* 105: 37-52.

Seamark RF, Nancarrow CD, Gardiner J. (1969). Progesterone metabolism in ovine blood: the formation of 3 $\alpha$ -hydroxypregn-4-en-20-one and other substances. *Steroids* 15: 589-604.

Sedláček M, Kořínek M, Petrovič M, Cais O, Adamusová E, Chodounská H, Vyklický L. Jr. (2008). Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic transmission. *Physiol Res* 57: 49-S57.

Senger PL. (1999). Pathways to pregnancy and parturition. Ed. Current conceptions, Inc 2<sup>a</sup> ed. Washington.

Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G, Okuda K. (2008). Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. *Reprod Dom Anim* 43:57-65.

Smith LW, Inskeep EK. (1970). Effect of progestins on lactation in the ewe. *J Anim Sci* 30:957-959.

Smith HE, Smith RG, Toft DO, Neergaard JR, Burrows EP, O'Malley BW. (1974). Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. *J Biol Chem* 249:5924-32.

Smith MF, McIntush EW, Smith GW. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 72:1857-1872.

Smith SS, Ruderman Y, Gong QH, Gulinello M. (2004). Effects of a low dose of ethanol in an animal model of premenstrual anxiety. *Alcohol* 33:41-49.

Smith SS, Shen H, Gong QH, Zhou X (2007). Neurosteroid regulation of GABA<sub>A</sub> receptors: Focus on the  $\alpha$ 4 and subunits. *Pharmacol Therap* 116:58-76.

Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC. (1998). Withdrawal from 3 $\alpha$ -OH-5 $\alpha$ -Pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA<sub>A</sub>-Gated current and increases the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 4 subunit in association with increased anxiety. *J Neurosci* 18:5275-5284.

Sphor L, Banchemo G, Correac G, Osórioa MTM, Quintans G. (2011). Early prepartum shearing increases milk production of wool sheep and the weight of the lambs at birth and weaning. *Small Ruminant Res* 99:44-47.

Starkey NJ, Bridges NJ. (2010). The effects of acute, chronic and withdrawn progesterone in male and female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) in two tests of anxiety. *Behav Brain Res* 207:490-499.

Stocco C, Telleria C, Gibori G. (2007). The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endo Rev* 28:117-149.

Stouffer, RL. (2006). Structure, function, and regulation of the corpus luteum. En: Neill JD. *Physiology of Reproduction*. Ed. Elsevier 3<sup>a</sup> ed. New York, pp. 475-526.

Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong Q, Sabado TN, Li X, Light A. (2002). Hormonally regulated  $\alpha 4\beta 2\delta$  GABAA receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* 5: 721-722

Torres-Hernández G y Hohenboken W. (1979). An attempt to assess traits of motionality in crossbred ewes. *Appl Anim Ethol* 5:71-83.

Ungerfeld R, Hötzel MJ, Scarsi A, Quintans G. (2011). Behavioral and physiological changes in early-weaned multiparous and primiparous beef cows. *Animal* 5:1270-1275.

Uphouse L, Hiegel H. (2013). An antiprogestin, CDB4124, blocks progesterone's attenuation of the negative effects of a mild stress on sexual behavior. *Behav Brain Res* 240:21-25.

Uphouse L, Adams S, Miryala CSJ, Hassell J, Hiegel C. (2013). RU486 blocks effects of allopregnanolone on the response to restraint stress. *Pharmacol Biochem Be* 103:568-572

Valera S, Ballivet M, Bertrand D. (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9949-9953.

Viérin M, Bouissou MF (2001). Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiol Behav* 72:579-587.

Vilariño M, Rubianes E, Van Lier E, Menchaca A. (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small Ruminant Res* 91:219-224.

Von Borell E, Langbein J, Després G, Hansen S, Leterrier C, Marchant-Forde J, Marchant-Forde R, Minero M, Mohr E, Prunier A, Valance D, Veissier I. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - a review. *Physiol Behav* 92: 293-316.

- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463:199-216.
- Wang M. (2011). Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Frontiers in Endocrinology* 2:1-23.
- Weary DM, Chua B. (2000). Effects of early separation on the dairy cow and calf: 1. Separation at 6 h, 1 day and 4 days after birth. *Appl Anim Behav Sci* 69:177-188.
- Weary DM, Fraser D. (1995). Signalling need: costly signals and animal welfare assessment. *Appl Anim Behav Sci* 44:159-169.
- Weary DM, Jasper J, Hötzel MJ. (2008). Understanding weaning distress. *Applied Anim Behav Sci* 110:24-41.
- Weiss JM. (1972). Influence of psychological variables on stress-induced pathology. En: Porter R, Knight J. *Physiology, emotion and psychosomatic illness*. Ed. CIBA Foundation Symposium 1<sup>a</sup> ed. Amsterdam, pp. 253-265.
- Wheaton JE, Carlson KM, Windels H, Johnston LJ. (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 33:127-141.
- Wheeler, AG, Land RB. (1977). Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. *Anim Prod* 24:363-376.
- White JM, CM Porth. (2000). Physiological measurement of the estres response. En: Rice VH. *Handbook of stress, coping, and health: implications for nursing research, theory, and practice*. Ed. Sage Publication 1<sup>a</sup> ed. California, pp. 69-96.
- Wood PJ, Gower DB. (2010). Analysis of progestagens. En: Makin HLJ, Gower DB. *Steroid analysis*. Ed. Springer 2<sup>a</sup> ed. Londres, pp.559-594.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. (1990). Inverse modulation of g-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol* 37:597-602.
- Wu FS, Lai CP, Liu BC. (2000). Non-competitive inhibition of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated currents by progesterone in rat nodose ganglion neurons. *Neurosci Lett* 278: 37-40.
- Zhang S, Jonklaas J, Danielsen M. (2007). The glucocorticoid agonist activities of mifepristone (RU486) and progesterone are dependent on glucocorticoid receptor levels but not on EC<sub>50</sub> values. *Steroids* 72:600-8.
- Zito CA, Wilson LL, Graves HB. (1975). Artificial rearing of lambs on growth and social behavior. *J Anim Sci* 41: 435 (resumen).

## **8. ANEXOS**