

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA INYECTABLE EN EL
MOMENTO DEL DESTETE SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS DE OVEJAS
EN ANESTRO**

Por

**ARAMBURU Julia Candela
BRIT Juan Ignacio
CASTELLS Felipe**

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Lic. Julia Giriboni

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Aline Freitas de Melo

Tercer miembro:

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto miembro:

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Quinto miembro:

Dra. Raquel Pérez

Fecha:

24 de Agosto de 2016

Autores:

Br. Julia Candela Aramburu

Br. Juan Ignacio Brit

Br. Felipe Castells

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a Aline, nuestra tutora, por su dedicación, motivación y apoyo que fueron muy importantes durante la realización de este trabajo. A nuestros cotutores Rodolfo Ungerfeld y Raquel Pérez por sus aportes y experiencia. También quisiéramos agradecerle a la Facultad de Veterinaria, a los profesores y compañeros que durante la carrera nos brindaron su conocimiento y contribuyeron en nuestra formación como profesionales. A Juan Pablo Damián, Fernando Perdigón y a los funcionarios del Campo Experimental Migués por su disposición y ayuda en la parte experimental de la tesis. A nuestros amigos por el apoyo de siempre. Por último, queremos dedicarles este trabajo y agradecerles a nuestras familias, por apoyarnos en los momentos difíciles de la carrera y disfrutar con nosotros los buenos momentos.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1 INTRODUCCIÓN	9
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 DESTETE NATURAL.....	10
2.2 DESTETE ARTIFICIAL	10
2.3 ESTRÉS.....	11
2.3.1 <i>Estrés y estresores</i>	11
2.3.2 <i>Respuesta de estrés</i>	12
2.3.3 <i>Indicadores de estrés</i>	12
2.4 PROGESTERONA Y RESPUESTA DE ESTRÉS	13
2.4.1 <i>Progesterona, metabolitos neuroactivos y respuesta de estrés: mecanismos de acción</i> 14	
3 HIPÓTESIS	16
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5 MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 LOCAL DE ESTUDIO, ANIMALES Y MANEJO	18
5.2 OBSERVACIONES DE COMPORTAMIENTO	18
5.3 MUESTREOS DE SANGRE	19
5.4 CAMBIOS FISIOLÓGICOS	19
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
6 RESULTADOS	20
6.1 REGISTROS COMPORTAMENTALES	20
6.1.1 <i>Posturas: parada, echada y caminando</i>	20
6.1.2 <i>Comportamientos alimenticios: pastando y rumiando</i>	22
6.1.3 <i>Comportamientos indicadores del estrés al destete: costear y vocalizar</i>	23
6.2 PESOS	24
6.3 CAMBIOS FISIOLÓGICOS	24
7 DISCUSIÓN	26
8 CONCLUSIÓN	28
9 BIBLIOGRAFÍA	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotropa

CIDR: controlled internal drug releasing

CRH: hormona liberadora de corticotropina

DHP: dihidroprogesterona

GABA_A: ácido gamma-aminobutírico

GC: ovejas no tratadas

GT: ovejas tratadas

HHA: eje hipotálamo-hipófiso-adrenal

HSD: hidroxisteroide dihidrogenasas

P4: progesterona

SC: subcutáneo

SNAS: sistema nervioso autónomo simpático

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Línea de tiempo con los registros realizados antes y después del destete.	18
Figura 2. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban paradas, echadas y caminando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete o en ovejas no tratadas.	21
Figura 3. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban pastando y rumiando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete o en ovejas no tratadas.	22
Figura 4. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban vocalizando y costeando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete o en ovejas no tratadas.	23
Figura 5. Las concentraciones de proteína sérica total, albúmina y globulinas antes y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete o en ovejas no tratadas.	25
Cuadro 1. Comportamientos registrados en las ovejas para evaluar los cambios comportamentales al destete.	19

RESUMEN

El destete artificial es un manejo necesario para mejorar los resultados productivos de las ovejas, aunque al mismo tiempo es un evento sumamente estresante. Se ha reportado que un tratamiento sostenido con progesterona (P4) disminuye la respuesta de estrés al destete en ovejas. El objetivo de nuestra tesis fue determinar si el tratamiento con P4 inyectable inmediatamente antes del destete artificial en ovejas en anestro reduce los cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés. El estudio se realizó en el Campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, en Canelones, Uruguay (34° 22' S, 55° 36' O). Se utilizaron 24 ovejas Corriedale multíparas de parto simple y en anestro, se asignaron a 2 grupos homogéneos, cada uno de 12 ovejas considerando la fecha de parto, el peso y el sexo de la cría. Un grupo fue tratado con 50 mg de P4 en base oleosa (MAD-4, Laboratorio Río de Janeiro, Argentina) inyectable SC el día del destete (GT) y el otro grupo permaneció como control, recibiendo el mismo volumen de aceite de girasol (GC). El destete se realizó a los 65 días del nacimiento (Día 0). Se registró el peso de las ovejas, las respuestas comportamentales (costeando, vocalizando, pastando, rumiando, echada, parada, caminando) y fisiológicas (concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas) antes y después del destete. Todos los comportamientos se modificaron con el tiempo ($P < 0,0001$). Las ovejas GT costearon y caminaron menos ($P < 0,0001$), rumiaron y estuvieron más tiempo echadas ($P = 0,0004$ y $P = 0,0019$ respectivamente) que las ovejas GC. Hubo interacción entre tratamiento y tiempo el día del destete en todos los comportamientos excepto para las variables echada y vocalizando. Independientemente de los tratamientos, las vocalizaciones aumentaron con el tiempo ($P < 0,0001$) y fueron máximas el día del destete. No hubo efecto del tratamiento, tiempo o interacción entre tratamiento y tiempo para las variables fisiológicas estudiadas, pero se observó una tendencia al aumento en la concentración de albúmina ($P = 0,09$) en ambos grupos a los 3 días del destete. En conclusión, el tratamiento con P4 redujo las respuestas comportamentales indicadoras de estrés al destete en ovejas en anestro.

SUMMARY

Artificial weaning is a management performed to improve productive results in sheep, however it is an extremely stressful event. It has been reported that sustained progesterone (P4) treatment decreases the stress response of ewes after weaning of their lambs. The aim of our thesis was to determine whether the injection of P4 immediately before artificial weaning of lambs reduces the behavioral and physiological changes indicators of stress response in anoestrus ewes. The study was conducted at the Experimental Field N°1, of the Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Canelones, Uruguay (34 ° 22 'S, 55 ° 36' W). Twenty-four multiparous single-lambing Corriedale ewes in anoestrus were used. Ewes were assigned to two homogeneous groups, each one of 12 ewes, considering the body weight, birth date and sex of the lamb. On weaning day, one group was treated with 50 mg of oil-based P4 (MAD-4, Rio de Janeiro Laboratory, Argentina) SC immediately before weaning (GT), and the other group remained as a control receiving the same volume of sunflower oil SC immediately before weaning (GC). Weaning took place 65 days after birth (Day 0). Before and after weaning the body weight of the ewes, the behavioral (pacing, vocalizing, grazing, ruminating, lying down, standing and walking) and physiological responses (total protein, albumin and globulins concentrations determined) were recorded. All behaviors were changed over time ($P < 0.0001$). There was group effect on pacing ($P = 0.0086$), GT ewes presented a lower frequency of pacing and walking ($P < 0.0001$) than the GC ewe. Moreover GT ewes presented a greater frequency of lying down ($P = 0.0004$) and ruminating ($P = 0.0019$) than the GC ewes. There was interaction between treatment and time on the day of weaning in all behaviors except for lying down and vocalizing. Regardless of treatment, frequency of vocalizations increase over time ($P < 0.0001$) and were greater on the day of weaning. Physiological variables studied did not changed with the time, there was no treatment effect, neither interaction between nutritional treatment and time, but albumin concentration tended to increase in both groups ($P = 0.09$) 3 days after weaning. In conclusion P4 treatment reduced the behavioral changes indicative of stress response at weaning in anoestrus ewes.

1 INTRODUCCIÓN

Un manejo usualmente utilizado en la cría ovina es el destete artificial, que se entiende por el momento en que se separa al cordero de su madre a una edad más temprana de lo que ocurriría en forma natural (Alexander, 1977). El destete artificial es necesario para mejorar los resultados productivos, ya que mejora la condición corporal y aumenta el peso de la oveja, influyendo de manera positiva en las tasas de concepción, prolificidad, peso de los corderos al parto y al destete (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). Sin embargo, constituye uno de los eventos más estresantes en la vida del animal, ya que las ovejas y los corderos manifiestan diferentes respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés. Por ello, este manejo estresante puede repercutir negativamente en el bienestar, rendimiento productivo y salud animal. Esta ruptura abrupta de las relaciones preferenciales como es el destete artificial da lugar a reacciones fisiológicas de estrés, tales como aumento de la liberación de cortisol y la alteración de los ritmos circadianos de actividad tanto de la madre como de la cría (Veissier y col., 1989 a, b). Por ejemplo, el estrés puede inducir un déficit funcional del sistema inmunológico (Coppinger y col., 1991; Cockram y col., 1993), lo que puede explicar el aumento de la incidencia de parasitosis en ovejas y corderos después del destete (Yvone y col., 1980). Se ha reportado que el tratamiento con progesterona (P4) reduce la respuesta al estrés debido a la acción de metabolitos neuroactivos de la P4 (allopregnanolona y pregnanolona) realizados en roedores (ratones: Wieland y col., 1991; ratas: Bitran, y col., 1991).

En ovinos los resultados obtenidos por Freitas-de-Melo y col. (2013) muestran que el tratamiento de larga duración con P4 aplicado mediante un dispositivo intravaginal (CIDR) reduce las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés al destete abrupto en la oveja. Por lo tanto, el tratamiento con P4 podría ser una buena herramienta para mitigar los efectos adversos provocados por el estrés al destete artificial. Desde el punto de vista práctico, este tratamiento no es viable, ya que es de larga duración, implica que los CIDR deban ser cambiados con frecuencia, más manejo de los animales y tiene alto costo. Esta Tesis se basa en estudiar si el tratamiento con P4 inyectable al momento del destete, disminuye los principales cambios comportamentales y fisiológicos provocados por el estrés en ovejas destetadas.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Destete natural

A partir del parto se forma un vínculo muy selectivo y fuerte entre la oveja y su cordero, el que sufre cambios graduales durante el período de lactación. Los cambios en la relación oveja-cordero están determinados por el desarrollo corporal de la cría durante el período de lactación y su necesidad de cuidados maternos. En condiciones naturales, el cordero va adquiriendo independencia social y nutricional, asociada a su desarrollo corporal, lo que culmina con el destete natural alrededor de los 4-5 meses de edad (Weary y col., 2008).

Por lo tanto, el destete natural es gradual e involucra dos procesos: la independencia de la madre como una fuente esencial para obtener alimento, y la separación de la madre como una compañía social (Haupt, 1988). El destete natural es un proceso donde la cría pasa gradualmente de consumir leche materna a tener como fuente de energía alimentos sólidos (Haupt, 1988). A lo largo del período de lactancia ocurre un aumento en la ingesta de comida sólida por parte de la cría y una disminución en la frecuencia de amamantamientos, asociada a una reducción en la producción de leche de la madre. Por ello, el destete natural abarca toda una gama de cambios en el comportamiento nutricional y en la morfología del cordero que constituyen la transición a un adulto independiente (Galef, 1981).

Los cambios generales en la relación madre-hijo (Martin, 1984), incluyen el incremento de la distancia madre-cría, acercamiento de los corderos a otras ovejas y una mayor interacción con otros corderos (Hinch y col., 1990). Inmediatamente luego del nacimiento, los corderos no son capaces de digerir comida sólida, pero el rumen se va desarrollando gradualmente dentro de las primeras 8-10 semanas, permitiéndole al cordero consumir progresivamente una mayor proporción de alimentos sólidos en relación a la leche (Haupt, 1988). Estos cambios implican pasar de un animal no rumiante a un animal rumiante y ocurren antes de la pérdida de la madre como compañía social (Haupt, 1988). Algunos autores muestran que las ovejas y sus corderos forman una relación a largo plazo que excede la edad natural del destete, por lo que entienden como destete natural, el momento en que el cordero deja de alimentarse de leche (Hinch y col., 1990; Rowell, 1991).

2.2 Destete artificial

Se entiende como destete artificial el momento en que se separa al cordero de su madre, lo que normalmente ocurre a una edad más temprana que la del destete natural, cuando todavía existe un fuerte vínculo entre la oveja y su cordero. Al separarlos de manera artificial es frecuente observar una marcada respuesta de estrés en ambos. Las ovejas muestran signos evidentes de estrés, incluyendo un aumento en la frecuencia de balidos y del tiempo que pasan caminando (Alexander, 1977). Luego de la separación de los corderos, las ovejas pasan más tiempo paradas con la cabeza levantada y las orejas erguidas, vocalizando y orientadas hacia el cordero (Cockram y col., 1993). Además, ocurre una disminución en los tiempos de descanso y rumia, indicando que la oveja percibe la separación de su cordero como un evento negativo (Cockram y col., 1993).

En condiciones de pastoreo, tanto las ovejas como sus corderos costean luego del destete (Damián y col., 2013; Freitas-de-Melo y col., 2013), lo que generalmente está asociado con vocalizaciones. Ambas conductas son desplegadas con el objetivo de encontrar y reunirse con su cría. Se observa una mayor frecuencia de vocalización del cordero y de su madre luego de la separación, incluso cuando se realiza un destete progresivo (Orgeur y col., 1998). Orgeur y col. (1999) obtuvieron resultados similares en cuanto a la respuesta comportamental e inmune en ovejas que habían sido parcial o totalmente separadas de sus corderos. Estos autores también demostraron que los corderos parecen ser más sensibles que las ovejas en la respuesta de estrés a la separación, ya que vocalizan más y exhiben una menor respuesta inmune humoral que las ovejas. Mears y Brown (1997) también registraron un aumento en la frecuencia de vocalización y en los niveles de cortisol en corderos destetados a las 7 semanas. Las ovejas también presentan un incremento en el cortisol sérico cuando son separadas de sus corderos (Pérez-León y col., 2006). Además, se ha determinado que ocurren cambios en las concentraciones de proteínas totales, globulinas y albúmina en las ovejas, disminuyendo las dos primeras y aumentando la albúmina luego del destete (Freitas-de-Melo y col., 2013).

Considerando que todos estos cambios comportamentales y fisiológicos, son indicadores de estrés, es posible afirmar que este manejo es considerado una situación estresante en la vida del animal, y por consiguiente afecta negativamente el bienestar.

2.3 Estrés

Dado que el destete es un evento estresante en el que se combinan factores nutricionales, sociales, físicos y psicológicos (Earley y col., 2010), es necesario revisar algunos conceptos básicos, relacionados a las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés.

2.3.1 Estrés y estresores

El término estrés se definió originalmente como la respuesta no específica del cuerpo a cualquier estímulo nocivo. Más tarde, el concepto fue redefinido y se distinguió entre "estresor" y "respuesta de estrés". Un estresor se considera un estímulo que amenaza la homeostasis, y la respuesta de estrés como la reacción del organismo con el objetivo de recuperar la homeostasis (Chrousos, 2009). Cannon (1929) utilizó el término "homeostasis" para describir a los "procesos fisiológicos coordinados que mantienen la mayoría de los estados estacionarios en el organismo", definiendo al sistema nervioso autónomo simpático (SNAS) como un sistema homeostático esencial que sirve para restablecer la homeostasis alterada inducida por el estrés y para promover la supervivencia del organismo.

La exposición a estresores se traduce en una serie de respuestas coordinadas para mejorar la adaptación y la probabilidad de supervivencia del individuo (Van de Kar y Blair, 1999). Estas respuestas, son conocidas como respuestas de estrés, y se componen de alteraciones fisiológicas y comportamentales, debido a la función del SNAS y la secreción de varias hormonas,

incluyendo la ACTH, glucocorticoides (cortisol y corticosterona), catecolaminas adrenales, oxitocina, prolactina y renina (Van de Kar y Blair, 1999).

En general, los estresores pueden ser agrupados en tres grandes categorías: a) los factores de estrés psicológicos, basados en la respuesta a una condición adversa inminente (el miedo, la ansiedad, la exposición a un entorno incontrolable); b) los factores de estrés que consisten en un estímulo físico (dolor, shock, inmovilización); y c) los factores de estrés que desafían la homeostasis cardiovascular (hemorragia, hipotensión ortostática, ejercicio, exposición al calor) (Van de Kar y Blair, 1999).

Selye (1976) propuso que la mayoría de los estímulos estresantes inducen dos tipos de respuestas: 1) una respuesta de estrés general, que es común a todos los estresores e implica la liberación de ACTH y glucocorticoides adrenales, y 2) las respuestas de estrés individuales, mediadas por "factores condicionantes", tales como la predisposición de origen genético.

2.3.2 Respuesta de estrés

El primer sistema que genera cambios ante un estresor es el SNAS, que estimula a la médula de las glándulas adrenales a secretar catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Las catecolaminas generan un rápido aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, midriasis y glucogenolisis. Cannon (1914) llamó a esta respuesta como teoría de la "huida o pelea". Simultáneamente, cuando se percibe un estresor, las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan un péptido (CRH). Esta hormona estimula a la adenohipófisis para que secrete la ACTH, la que estimula a la corteza adrenal para que secrete glucocorticoides. Esta serie de eventos se conoce como activación del eje HHA, y forma parte de la respuesta neuroendocrina al estrés (Selye, 1936, 1946).

Algunos de los cambios fisiológicos y comportamentales asociados con la respuesta al estrés son: 1) la movilización de energía para mantener el funcionamiento del cerebro y del músculo; 2) el aumento del estado de alerta; 3) el aumento de las tasas de perfusión cerebral y utilización de la glucosa cerebral; 4) el aumento de la frecuencia respiratoria y cardiovascular, la redistribución del flujo sanguíneo, aumentando la energía que llega al cerebro y a los músculos; 5) la modulación de la función inmune; 6) el efecto negativo en el control fisiológico de la reproducción y del comportamiento sexual; 7) la disminución de la alimentación y del apetito (Sapolsky y col., 2000; Habib y col., 2001).

2.3.3 Indicadores de estrés

Dado que la respuesta al estrés provoca cambios comportamentales y fisiológicos, se pueden utilizar estos parámetros, para estudiar la respuesta de estrés en los animales. De acuerdo con Rushen (2000), lo atractivo de los cambios comportamentales yace en el hecho de que se manifiestan rápidamente y son fáciles de observar y medir. Los cambios en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas son considerados indicadores de estrés en rumiantes (Apple y col., 1993). La concentración de proteínas totales disminuye y la concentración de

albúmina aumenta luego del destete en ovejas y vacas (Freitas-de-Melo y col., 2013).

El aumento de cortisol sérico es el indicador de estrés fisiológico clásico (Rhind y col., 1998); como ya se mencionó, las ovejas muestran un gran incremento del mismo cuando son separadas de sus corderos (Pérez-León y col., 2006). Estas, incrementan la frecuencia cardíaca mientras que disminuyen el tiempo de rumia y están más tiempo paradas jadeando luego del transporte y al aislarlas socialmente, ya que son animales gregarios (Cockram y col., 1994, 1996).

2.4 Progesterona y respuesta de estrés

Los resultados obtenidos por Freitas-de-Melo y col. (2013) muestran que el tratamiento con P4 de larga duración aplicado a partir de un dispositivo intravaginal (CIDR) reduce las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés de la oveja al destete abrupto. Las principales variables comportamentales (costear y vocalizar), y la mayoría de las variables fisiológicas (concentraciones de proteínas totales y globulinas) consideradas indicadoras de estrés al destete en ovejas, fueron mitigadas por el tratamiento con P4. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en roedores en los que se demostró que el tratamiento con P4 reduce la respuesta de estrés o ansiedad en manejos antes del sacrificio (Barbaccia y col., 2001). Destetar los corderos causó una reducción en la concentración de proteínas totales y globulinas en las ovejas, respuestas que fueron reducidas por el tratamiento con P4 (Freitas-de-Melo y col., 2013). Estos resultados son interesantes desde una perspectiva productiva; el tratamiento con P4 puede ser una alternativa interesante para disminuir las respuestas fisiológicas y comportamentales, indicativas de estrés de las ovejas en respuesta a un destete abrupto de los corderos.

En roedores se ha demostrado que metabolitos de la P4 con grupo 3α -hydroxy, llamados 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 en que se determinaron los efectos del tratamiento con P4 (ratas: Heinsbroek y col., 1988; Bitran y col., 1993; Barbaccia y col., 1998; ratones: Gomez y col., 2002; Reddy y col., 2005; Ducharme y col., 2010) o de la suspensión del mismo (ratas: Gallo y Smith, 1993; Löfgren y col., 2006, Löfgren y col., 2009; meriones: Starkey y Bridges, 2010) sobre la respuesta de estrés o ansiedad fueron realizados en roedores, existiendo hasta la fecha pocos trabajos en rumiantes que lo hayan estudiado "in vivo". Si bien Viérin y Bouissou (2001) determinaron que las ovejas gestantes, caracterizadas por presentar altas concentraciones de P4 tienen menor respuesta de estrés al test de aislamiento social que las ovejas no gestantes, los resultados no permitieron adjudicarle dicho efecto a la P4. Orihuela y col., (2002) no encontraron diferencia en la respuesta del estrés del transporte entre ovejas en diestro y proestro, aunque en este caso no se definió el efecto de la P4 por sí misma. Por el contrario, Freitas-de-Melo y col. (2015) observaron una mayor respuesta al aislamiento social luego de la disminución brusca de las concentraciones de P4.

2.4.1 Progesterona, metabolitos neuroactivos y respuesta de estrés: mecanismos de acción

La P4 es una hormona esteroidea producida tanto en machos como en hembras en la corteza adrenal, gónadas (solamente en hembras), SNC, SNP y placenta durante la preñez (Lo y Lamb, 2004; Rhen y Cidlowski, 2004; Strauss, 2004; Yen, 2004). Los mecanismos por los que la P4 o sus metabolitos reducen la respuesta de estrés continúan bajo estudio. Estos efectos se producen con una latencia de segundos a un par de minutos (Towle y Sze, 1983). Se han encontrado sitios de unión específicos para la P4 que se asocian con la membrana plasmática sináptica (Towle y Sze, 1983). En la actualidad es ampliamente aceptado que estos neuroesteroides ejercen muchos de sus efectos centrales a través de la modulación alostérica positiva del complejo receptor GABA_A (Majewska, 1992; Lambert y col., 1995).

La P4 se sintetiza a partir de pregnenolona, un derivado del colesterol (Strauss, 2004; Schumacher y col., 2007). En la biosíntesis de la P4, el colesterol es convertido a través de la acción enzimática en pregnenolona, que luego se convierte en P4. Además de su papel en la reproducción, el estradiol y la P4 modulan una variedad de comportamientos no reproductivos, tales como depresión, ansiedad, irritabilidad y miedo (Brot y col., 1995; Hiroi y Neumaier, 2006; Frye, 2007; Auger y Forbes-Lorman, 2008). La P4 tiene acción ansiolítica potente que se atribuye a sus metabolitos neuroactivos (allopregnanolona y pregnanolona). Por ejemplo, la allopregnanolona actúa como modulador alostérico positivo en los receptores GABA_A, generando un efecto inhibitorio en el SNC en roedores (Bitran y col., 1993; Frye y col., 2000; Reddy y col., 2005; Eser y col., 2008).

La metabolización de la P4 ocurre principalmente en el hígado (Pluchino y col., 2009), pero también puede ocurrir en los riñones y pulmones (Piccinato, 2008). Como la P4 es una hormona lipofílica y de bajo peso molecular, puede atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, donde puede ser metabolizada en las neuronas y células de la glía presentes en muchas áreas del cerebro, más notoriamente en la corteza y en el hipocampo (Compagnone y Mellon, 2000; Birzniece, 2004). En estas áreas del cerebro, al ser metabolizada se forman sus metabolitos neuroactivos, uniéndose a las enzimas 5 α y β reductasa. Luego de esta reducción, se obtienen los metabolitos 5 α o 5 β pregnanediona (5 α o 5 β DHP); estos últimos sufren una segunda reducción reversible e irreversible respectivamente por la 3 α y 3 β HSD, formando los isómeros pregnanolonas (Wood y Gower, 2010), siendo los neuroactivos aquellos con grupo 3 α -hydroxy: la allopregnanolona y pregnanolona (Phillipps, 1975; Majewska y col., 1986).

En varios estudios se ha demostrado que estos metabolitos neuroactivos interactúan con el sitio de unión de esteroides en el receptor GABA_A (Harrison y Simmonds, 1984; Majewska y col., 1986; Peters y col., 1988; Turner y col., 1989). El receptor GABA_A se conoce por mediar la acción del principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de los vertebrados, lo que aumenta el nivel de inhibición GABAérgica en el SNC (Majewska y col., 1986). El tratamiento con un inhibidor de la 5 α -reductasa que previene la conversión de P4 a allopregnanolona elimina la actividad ansiolítica de la P4 (Bitran y col., 1995). Algunos de los efectos neuromoduladores y efectos protectores de la P4 son adjudicados a la

allopregnanolona. Específicamente, la allopregnanolona produce efectos anticonvulsivos, antidepresivos, ansiolíticos y neuroprotectores en animales de experimentación, así como en tejidos y cultivos celulares (Singh, 2005; Finn y col., 2006; Schumacher y col., 2007).

En síntesis, la allopregnanolona y pregnanolona juegan un papel importante en la fisiopatología de la ansiedad. Estos efectos de los metabolitos de P4 están mediados por los receptores GABA_A (Bitran y col., 1991), ya que a través de estos receptores se suprime la excitabilidad del SNC (Crossley y col., 1997, Nicol y col., 1997), además de los de glutamato y acetilcolina que tienen influencia en las emociones, la memoria, el aprendizaje y la respuesta de estrés de forma rápida (Mellon y Griffin, 2002; Dubrovsky, 2005; Strous y col., 2006).

3 HIPÓTESIS

El tratamiento con P4 inyectable de larga acción inmediatamente antes del destete artificial disminuye la respuesta de estrés en ovejas en anestro.

4 OBJETIVOS

Determinar si el tratamiento con P4 inyectable de larga duración inmediatamente antes del destete artificial en ovejas en anestro reduce:

- a) La respuesta comportamental indicadora de estrés, medida a través de la frecuencia de vocalización, costeando, caminando, parada, echada, rumiando y pastando.
- b) La respuesta fisiológica indicadora de estrés, medida a través de las proteínas totales, albúmina y globulinas.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Local de estudio, animales y manejo

El estudio se realizó en primavera en el Campo Experimental N° 1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, en Canelones (34° 22' S, 55° 36' O), Uruguay. Se utilizaron 24 ovejas Corriedale multíparas de parto simple con 60 días de lactancia en anestro con un peso de $47,3 \pm 0,9$ kg (media \pm SEM).

Las ovejas se adjudicaron a 2 grupos homogéneos considerando fecha de parto, peso y sexo de la cría. Un grupo de 12 ovejas recibió P4 (50 mg en base oleosa, MAD-4, Laboratorio Río de Janeiro, Argentina) inyectada SC el día del destete (GT). El otro grupo permaneció como control, recibiendo el mismo volumen de aceite de girasol (GC). Se destetaron los corderos a los 65 días de nacidos (Día 0) los que se llevaron a un potrero alejado sin contacto visual ni auditivo con sus madres, permaneciendo las ovejas en los mismos potreros (Figura 1).

El potrero utilizado para los animales era de 4 háas, y estaba dividido por hilo eléctrico a la mitad, asignando una subdivisión para cada grupo. La pastura ofrecida fue trébol blanco (*Trifolium repens*) y festuca (*Festuca arundinacea*) con oferta de forraje ad libitum, permaneciendo los animales allí durante 7 días (desde el -3 al 3) (Figura 1).

Al comienzo y final del experimento (días -5 y 3) se registraron en la mañana los pesos vivos de las ovejas con balanza portátil (Figura 1).

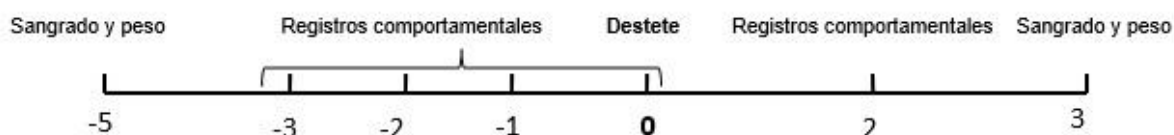


Figura 1. Línea de tiempo (días) con los registros realizados antes y después del destete.

5.2 Observaciones de comportamiento

Para facilitar las observaciones con binoculares desde fuera del potrero, se pintaron diferentes números en el flanco de las ovejas. Las observaciones se realizaron mediante registros scan, cada 10 min, durante 3 h en la mañana (8:00 a 11:00 h) y 3 h en la tarde (14:30 a 17:30 h). Se asignó un observador entrenado a cada grupo, el que iba rotando entre los grupos estudiados. Los comportamientos registrados mediante scan fueron: parada, echada, caminando, costeando, pastando y rumiando, mientras que vocalizando se registró mediante muestreo 0/1 cada 10 min durante 30 s (Cuadro 1).

Cuadro 1. 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 masticando 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	Moviéndose 1-2 m paralelamente al alambrado
Amamantando	El cordero succionando el pezón de la ubre
Vocalizando	Balando con la boca abierta o cerrada

5.3 Muestras de sangre

Se colectaron muestras de sangre por venopunción de la yugular para determinar las concentraciones de proteínas totales y albúmina en los días -5 y 3. Las muestras fueron colectadas en tubos sin anticoagulante y centrifugadas durante 10 minutos a 1500g. El suero obtenido se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

5.4 Cambios fisiológicos

El análisis de sangre se realizó en el laboratorio del Área de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Se determinó la concentración de proteínas totales y albúmina de los sueros colectados por la técnica de Biuret y por un kit comercial (Bio-systems, Barcelona, España), respectivamente. La concentración de globulinas se estimó por la diferencia entre albúmina y proteínas totales (Säkkinen y col., 2005).

5.5 Análisis estadístico

Se calculó la frecuencia de observaciones en el que cada oveja realizó cada comportamiento. Las frecuencias de los comportamientos, el peso corporal y las concentraciones de proteínas totales, albúmina y globulinas fueron comparadas entre los tratamientos con ANOVA para mediciones repetidas. Utilizando el mix model de SAS (2003; SAS Institute, Carolina del Norte, EUA), considerando el efecto del tiempo, tratamiento e interacción entre tratamiento y tiempo.

6 RESULTADOS

6.1 Registros comportamentales

6.1.1 Posturas: parada, echada y caminando

No hubo efecto del tratamiento en la frecuencia en que los animales estuvieron parados. Se observaron cambios con el tiempo ($P < 0,0001$): las ovejas disminuyeron la frecuencia en que estuvieron paradas el día del destete, sin volver a sus valores iniciales 2 días luego del destete (Figura 2A). Hubo interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,0002$), las ovejas GC estuvieron menos tiempo paradas que las ovejas GT, el día del destete ($P < 0,05$) y a los 2 días luego del destete ($P < 0,01$).

Las ovejas GT pasaron más tiempo echadas que las ovejas GC ($18,6 \pm 1,3$ % vs $10,9 \pm 1,3$ % respectivamente; $P = 0,0004$). Se observaron cambios en el tiempo ($P < 0,0001$): las ovejas pasaron menos tiempo echadas el día del destete, volviendo a sus niveles iniciales 2 días luego del destete (Figura 2B). Hubo interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,0003$): las ovejas GT pasaron más tiempo echadas luego del destete que las ovejas GC ($P < 0,0001$).

Las ovejas GT caminaron menos que las ovejas GC ($3,37 \pm 0,6$ % vs $9,28 \pm 0,6$ % respectivamente; $P < 0,0001$). Se observaron cambios en el tiempo ($P < 0,0001$) ambos grupos disminuyeron la frecuencia que caminaron dos días luego del destete (Figura 2C). Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,0005$), las ovejas GC el día del destete mantuvieron los niveles iniciales ($P < 0,0001$), disminuyendo 2 días luego del destete ($P < 0,0001$), mientras que las ovejas GT caminaron menos en ambos momentos.

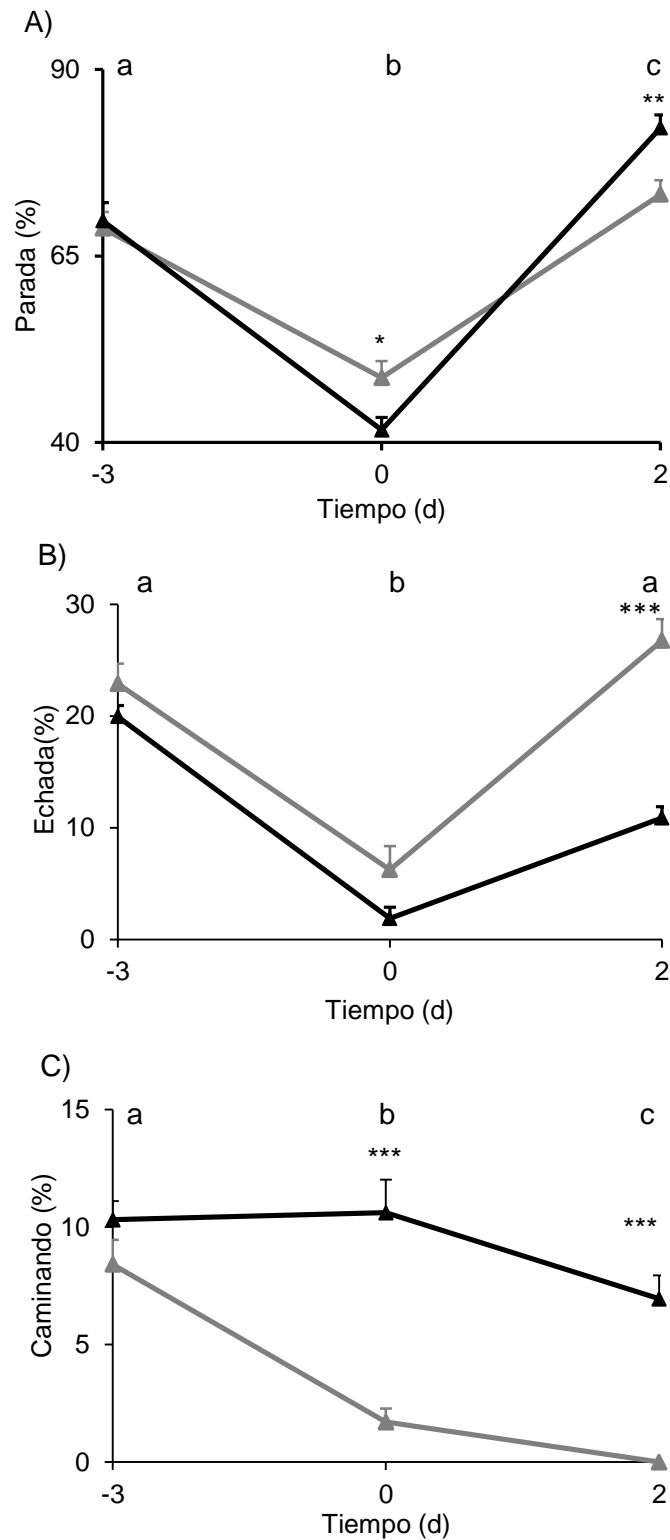


Figura 2. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban (A) paradas, (B) echadas y (C) caminando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete (-▲-) o en ovejas que quedaron sin tratamiento (-▲-) (Media \pm SEM). Día 0 = destete artificial. Diferentes letras indican diferencias entre los días ($P < 0,01$). Los asteriscos indican diferencias entre los grupos (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,0001$).

6.1.2 Comportamientos alimenticios: pastando y rumiando

No hubo efecto del tratamiento sobre la frecuencia en que las ovejas estuvieron pastando. Se observaron cambios en el tiempo ($P < 0,0001$): las ovejas disminuyeron la frecuencia en la que estuvieron pastando el día del destete, sin embargo a los 2 días luego del destete fue mayor que los niveles iniciales (Figura 3A). Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,0002$): 3 días antes del destete ($P < 0,05$) las ovejas GT pastaron más, pero sin embargo el día del destete hubo una tendencia ($P < 0,1$) a que las ovejas GC pastaron más.

Las ovejas GT rumiaron más que las ovejas GC ($20,1 \pm 0,9 \%$ vs $15,5 \pm 0,9 \%$ respectivamente; $P = 0,0019$). Se observaron cambios en el tiempo ($P < 0,0001$): las ovejas rumiaron menos el día del destete, volviendo a sus valores basales luego del destete (Figura 3B). Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ($P = 0,0004$): las ovejas GT rumiaron más que las GC tanto el día del destete ($P < 0,05$) como 2 días después ($P < 0,0001$).

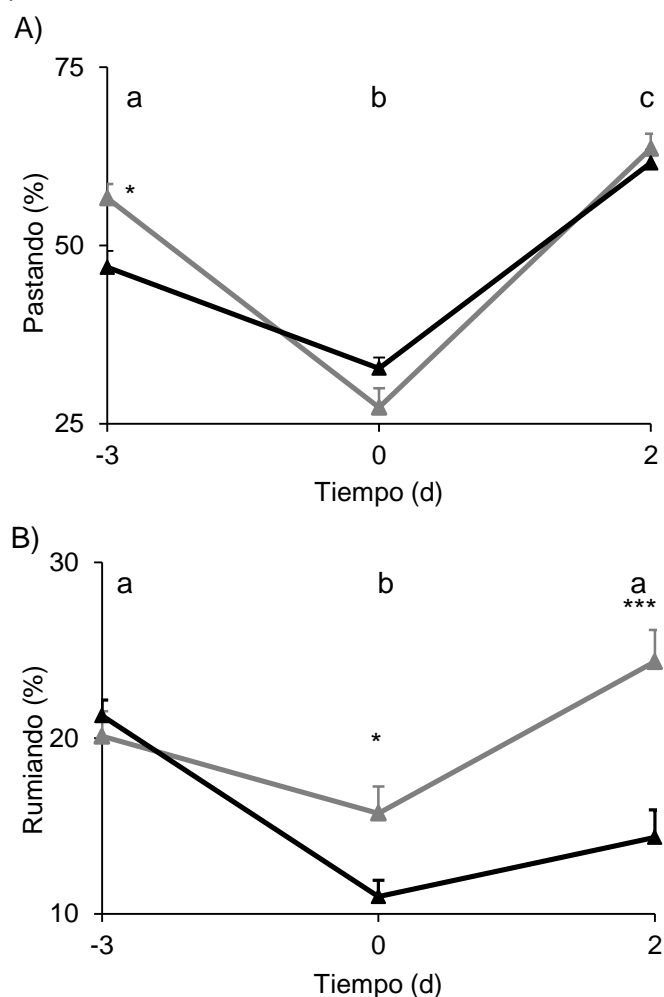


Figura 3. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban (A) pastando y (B) rumiando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete (-▲-) o en ovejas que quedaron sin tratamiento (-▲-) (Media \pm SEM). Día 0 = destete artificial. Diferentes letras indican diferencias entre los días ($P < 0,01$). Los asteriscos indican diferencias entre los grupos (* $P < 0,05$ y *** $P < 0,0001$).

6.1.3 Comportamientos indicadores del estrés al destete: costear y vocalizar

Las ovejas GT costearon menos que las ovejas GC ($0,06 \pm 0,2$ % vs $0,9 \pm 0,2$ % respectivamente; $P=0,0086$). Este comportamiento también cambió con el tiempo ($P<0,0001$): las ovejas costearon el día del destete (Figura 4A). Hubo una interacción entre tratamiento y tiempo ($P=0,0009$): el día del destete ($P<0,0001$) se observó que las ovejas del GC costearon más que las ovejas del GT.

No hubo efecto del tratamiento, ni interacción entre tratamiento y tiempo en la frecuencia en que los animales vocalizaron. Se observaron cambios con el tiempo ($P<0,0001$): las ovejas vocalizaron más el día del destete, volviendo a sus niveles basales a los 2 días luego del destete (Figura 4B).

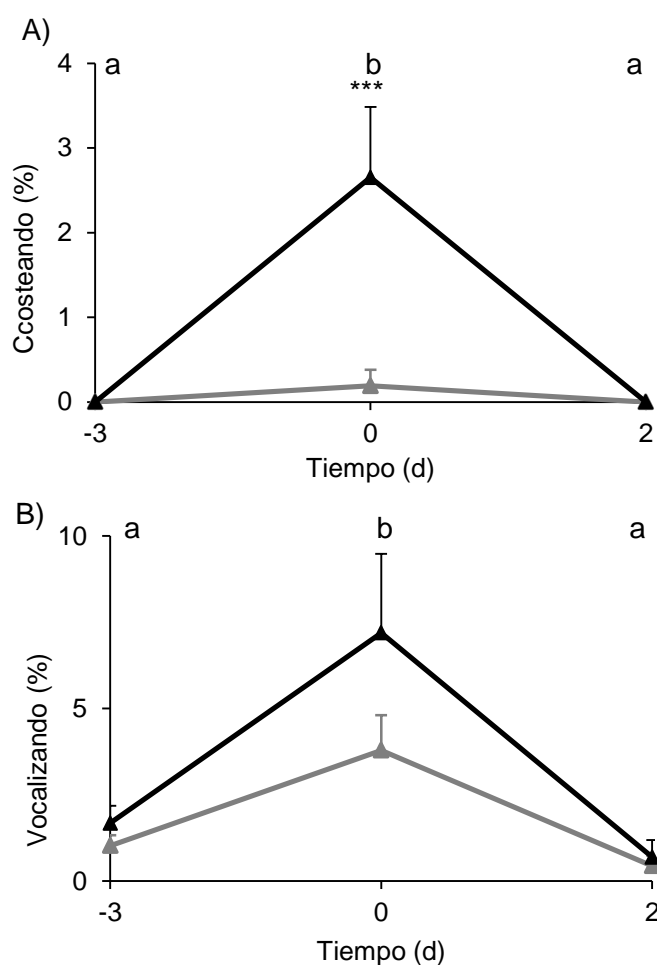


Figura 4. Frecuencia de observaciones en que las ovejas estaban (A) costeando y (B) vocalizando antes, el día y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete (-▲-) o en ovejas que quedaron sin tratamiento (-▲-) (Media \pm SEM). Día 0 = destete artificial. Diferentes letras indican diferencias entre los días ($P<0,01$). Los asteriscos indican diferencias entre los grupos (* $P<0,05$ y *** $P<0,0001$).

6.2 Peso corporal

El peso corporal de las ovejas no fueron afectados, ni por el tratamiento ni por el tiempo (antes del destete: $47,1 \pm 1,2$ kg vs. $47,4 \pm 1,3$ kg, ovejas GC y GT respectivamente; luego del destete: $46,6 \pm 1,1$ kg vs. $46,4 \pm 1,3$ kg). Tampoco hubo interacción entre tratamiento y tiempo.

6.3 Cambios fisiológicos

No hubo efecto del tratamiento en la concentración de proteínas totales, albúmina o globulinas. No hubo efecto tiempo ni en las proteínas totales ni en las globulinas, pero se observó una tendencia al aumento de la concentración de albúmina a los 3 días del destete ($P=0,09$) (Figuras 5A, 5B, 5C). No hubo interacción entre tratamiento y tiempo en la albúmina, existiendo una tendencia en las proteínas totales ($P=0,08$) y globulinas ($P=0,07$).

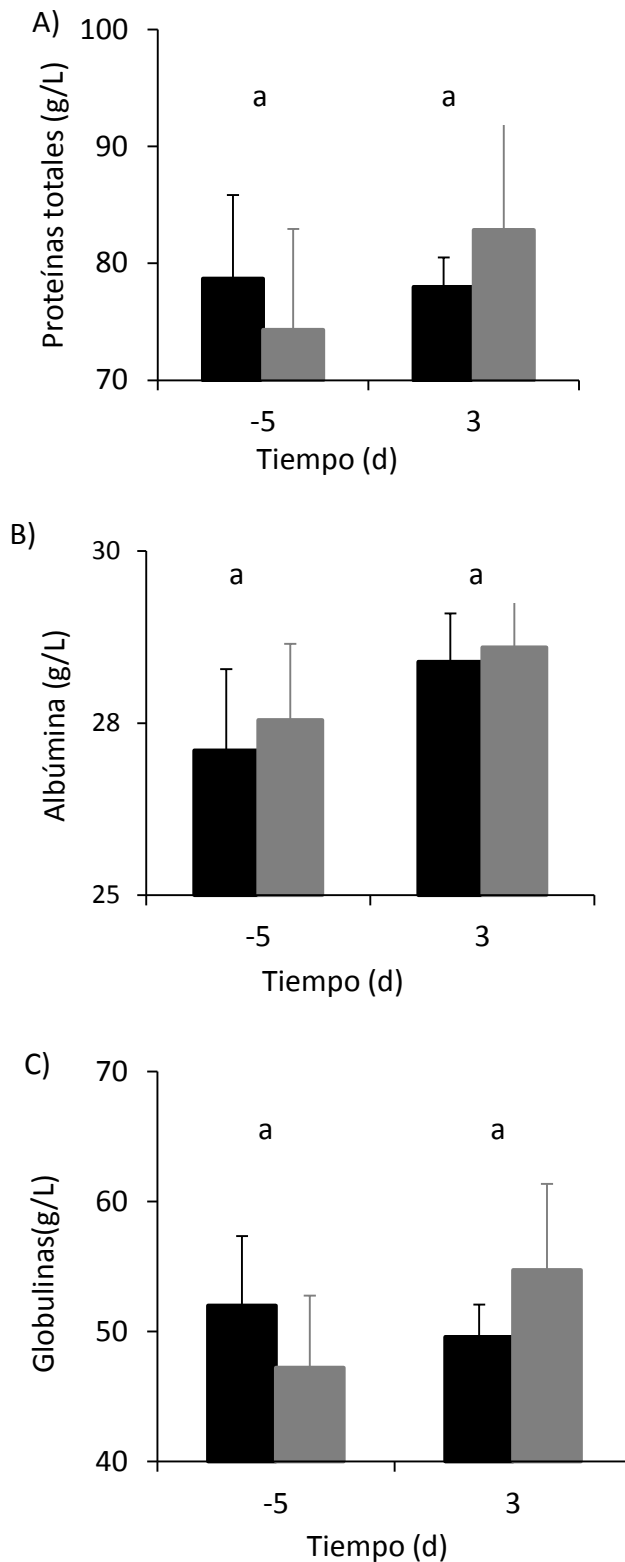


Figura 5. Las concentraciones de (A) proteínas totales, (B) albúmina y (C) globulinas antes y después del destete en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes del destete (barras grises) (GT) o en ovejas que quedaron sin tratamiento (barras negras) (GC) (Media \pm SEM). Día 0 = destete artificial.

7 DISCUSIÓN

De manera general, el tratamiento con P4 inyectable de larga duración inmediatamente antes del destete artificial, disminuyó la respuesta de los cambios comportamentales indicadores de estrés al destete de las ovejas, cambios que implican alto gasto energético y están relacionados con la búsqueda de la cría (costeando y caminando). Las diferencias en el aumento de estos comportamientos, no determinaron diferencias en la pérdida de peso entre los grupos. Además, el destete tampoco produjo una reducción de peso en las ovejas, por lo menos hasta los 3 días luego del destete. Los cambios comportamentales al destete (aumento de comportamientos relacionados a la búsqueda de la cría y reducción en el tiempo de descanso y alimentación) son agudos, y las ovejas retornan a los valores basales a los 3 días luego del destete coincidiendo con Freitas-de-Melo y col. (2013), probablemente no siendo tiempo suficiente para generar una pérdida de peso. Es interesante que no se observó una respuesta fisiológica a los 3 días luego del destete, quizás influenciado por el día en que se realizó la medición, ya que las proteínas totales tienen una respuesta lenta y se midió solamente al tercer día después del destete. Sería interesante repetir la medición más tarde para determinar si pudiera haber existido una variación debido al destete o diferencias entre grupos.

De modo general, el destete generó cambios en todos los comportamientos observados, reafirmando que éste es un manejo estresante (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). El destete determinó aumentos en las frecuencias de los comportamientos relacionados con la búsqueda de la cría, por lo que los animales redujeron el tiempo dedicado a la alimentación y descanso. A diferencia de las ovejas GT, las ovejas GC desplegaron un mayor aumento en la frecuencia de los comportamientos que gastan energía (caminando y costeando) y una reducción de aquellos que aportan energía e indican bienestar (pastando, rumiando y echada). Si bien no se estudiaron los mecanismos relacionados a los efectos de la P4, especulamos que la reducción de la respuesta comportamental de estrés al destete, serían debidos a la acción de los metabolitos neuroactivos, ya que se ha demostrado que estos metabolitos reducen la respuesta de estrés y ansiedad en roedores (Bitran y col., 1993, Barbaccia y col., 1998). Este tratamiento ayudaría a las ovejas a trascurrir el destete con un mejor bienestar, lo que implica mayor armonía del animal con su medio ambiente (Broom, 1991).

Los cambios en la frecuencia de los comportamientos costeando y vocalizando fueron los más notorios al momento del destete artificial, aumentando de gran manera en ambos grupos, ya que son los comportamientos más indicativos de la respuesta de estrés al destete (desplegados por la oveja por intentar buscar a su cría). Dos días luego del destete ambos grupos volvieron a los niveles basales, debido a que se trata de una respuesta aguda y de gran demanda energética. Probablemente al no recibir respuesta de las crías, las ovejas dejan de realizar dichos comportamientos. La frecuencia en que los animales estuvieron pastando y rumiando disminuyó el día del destete, ya que las ovejas se concentran en buscar a su cría y dejan de realizar estas actividades. Sin embargo, a los 2 días luego del destete ambos grupos pastaron más, incluso superando los niveles iniciales, lo que podría explicarse como un comportamiento compensatorio, comiendo lo que dejó de comer el día del destete. Según Newman y col. (1994) luego de un ayuno de 24 horas las ovejas aumentan la ingesta diaria total, incrementando el tiempo de

pastoreo. Greenwood y Demment (1988) encontraron que animales ayunados durante 36 horas pastorearon un 45% más que animales sin ayuno. Además, a los 2 días del destete, las ovejas GT rumiaron más que los días previos al destete y las ovejas GC rumiaron menos que los niveles iniciales. Esto puede deberse a que las ovejas GT estaban más tranquilas, ya que la rumia, que es un indicador de bienestar animal, se afecta en menor medida. Por ejemplo, se podría sugerir que al rumiar más tiempo las ovejas GT asimilaron o favorecieron la fermentación ruminal de los alimentos consumidos. En vaquillonas la rumia disminuye tras la administración de ACTH (Negrao y col., 2010), indicando que este comportamiento es afectado con la respuesta de estrés.

Además de disminuir la intensidad de la respuesta de estrés, el tratamiento con P4 probablemente también disminuyó el período en el que los animales se encontraban estresados, representado en un rápido retorno a los niveles basales de algunos comportamientos (costeando y vocalizando).

Esto indica que el tratamiento permite generar alternativas de aplicación práctica, en las que no se vea perjudicado el manejo y se mejore el bienestar.

8 CONCLUSIÓN

El tratamiento con P4 inyectable de larga duración inmediatamente antes del destete redujo las respuestas comportamentales indicadoras de estrés en ovejas en anestro.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander G (1977). Role of auditory and visual cues in mutual recognition between ewes and lambs in Merino sheep. *Appl Anim Ethol*; 3:65–81.
2. 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. *J Anim Sci*; 71:71-77.
3. Auger CJ, Forbes-Lorman RM (2008). Progesterin receptor-mediated reduction of anxiety-like behavior in male rats. *PLoS ONE*; 3:e3606.
4. Barbaccia ML, Concas A, Serra M, Biggio G (1998). Stress and neurosteroids in adult and aged rats. *Exp Gerontol*; 33:697-712.
5. Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G (2001). Stress and neuroactive steroids. *Int Rev Neurobiol*; 46:243-272.
6. Birzniece V (2004). Neuroactive steroids and rat CNS. Thesis Umeå University, 91p.
7. Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991). Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [β]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA_A receptor. *Brain Res*; 561:157-161.
8. Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK (1993). Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA_A receptor function. *Pharmacol Biochem Behav*; 45:423–428.
9. Bitran D, Shiekh M, McLeod M (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptors. *J Neuroendocrinol*; 7:171-177.
10. Broom DM (1991). Animal welfare: concepts and measurement. *J Anim Sci*; 69:4167-4175.
11. Brot MD, Koob GF, Britton KT (1995). Anxiolytic effects of steroid hormones during the estrous cycle. Interactions with ethanol. *Recent Dev Alcohol*; 12:243–259.
12. Cannon WB (1914). The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol*; 33:356-372.
13. Cannon WB (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev*; 9: 399-431.
14. Chrousos GP (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*; 5:374–381.
15. 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.
16. Cockram MS, Ranson M, Imlah P, Goddard PJ, Burrells C, Harkiss GD (1994). The behavioural, endocrine and immune responses of sheep to isolation. *Anim Sci*; 58:389-399.
17. Cockram MS, Kent JE, Goddard PJ, Waran NK, McGilp IM, Jackson RE, Muwanga M, Prytherch S (1996). Effect of space allowance during transport on the behavioural and physiological responses of lambs during and after transport. *Anim Sci*; 62:461-477.
18. Compagnone NA, Mellon SH (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*; 21:1-56.

19. Coppinger TR, Minton JE, Reddy PG, Blecha F (1991). Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary–adrenal secretions and reduces cell-mediated immunity. *J Anim Sci*; 69:2808–2814.
20. Crossley KJ, Nicol MB, Hirst JJ, Walker DW, Thorburn GD (1997). Suppression of arousal by progesterone in fetal sheep. *Reprod Fertil Dev*; 9:767–773.
21. Damian JP, Hötzel MJ, Banchero G, Ungerfeld R (2013). Behavioural response of grazing lambs to changes associated with feeding and separation from their mothers at weaning. *Res Vet Sci*; 95:913–918.
22. Dubrovsky BO (2005). Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuro-psychoph*; 29:169–192.
23. 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.
24. 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.
25. Eser D, Baghai TC, Schüle C, Nothdurfter C, Rupprecht R (2008). Neuroactive steroids as endogenous modulators of anxiety. *Curr Pharm Des*; 14:3525-3533
26. Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM (2006). A new look at the 5 α -reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev*; 12:53–76.
27. Freitas-de-Melo A, Banchero G, Hötzel MJ, Damián JP, Ungerfeld R (2013). Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal*; 7.8:1367-1373.
28. Freitas-de-Melo A, Damián JP, Hötzel MJ, Banchero G, Ungerfeld R (2015). Progesterone pretreatment increases the stress response to social isolation in ewes. *Hormones*; 15(1):81-87.
29. Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R (2016). Destete artificial en ovinos: respuesta de estrés y bienestar animal. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*; 7(3):361-375.
30. Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α ,5 α -THP. *Pharmacol Biochem Behav*; 67:587–596.
31. Frye CA (2007). Progestins influence motivation, reward, conditioning, stress, and/or response to drugs of abuse. *Pharmacol Biochem Behav*; 86:209–219.
32. Galef BG (1981). The ecology of weaning: parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. En: Gubernick DJ y Klopfer PH. *Parental Care in Mammals*. New York, Plenum press, pp 211-241.
33. 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 Behav*; 46:897-904.
34. Gomez C, Saldivar-Gonzalez A, Delgado G, Rodriguez R (2002). Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 72:543-550.
35. Greenwood GB, Demment MW (1988). The effect of fasting on short-term cattle grazing behaviour. *Grass Forage Sci*; 43:377-386.

36. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrin Metab Clin*; 30:695–728.
37. Harrison NL, Simmonds MA (1984). Modulation of the GABA_A receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res*; 323:287–292.
38. Heinsbroek RPW, van Haaren F, van de Poll NE (1988). Effects of Progesterone on Open Field Behavior of Food Deprived Ovariectomized Female Rats. *Physiol Behav*; 43:779-782.
39. Hinch GN, Lynch JJ, Elwin RL, Green GC (1990). Long-term associations between Merino ewes and their offspring. *Appl Anim Behav Sci*; 27:93–103.
40. Hiroi R, Neumaier JF (2006). Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behav Brain Res*; 166:93–100.
41. Hout KA (1988). *Domestic Animal Behaviour for Veterinarians and Animal Scientists*, 3a ed. Iowa State Univ. Press, Ames, p. 197.
42. Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA (1995). Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci*; 16:295–303.
43. Lo KC, Lamb DJ (2004). The testis and male accessory organs. En: Strauss JF, Barbieri RL. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management*. 5a ed. Philadelphia, ed. Elsevier, pp. 367–387.
44. Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Bäckström T (2006). Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav*; 50:208-215.
45. 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.
46. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA_A receptor. *Science*; 232:1004–1007.
47. Majewska MD (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol*; 38:379–395.
48. Martin P (1984). The meaning of weaning. *Appl Anim Behav Sci*; 32:1257-1258.
49. Mears GJ, Brown FA (1997). Cortisol and β -endorphin responses to physical and psychological stressors in lambs. *Can J Anim Sci*; 77:689–694.
50. Mellon SH, Griffin LD (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*; 13:35–43.
51. Negrao JA, Felicio Porcionato MA, Passille AM, Rushen J (2010). Behavioural responses of heifers to ACTH injections. *Appl Anim Behav Sci*; 128:18-22.
52. Newman JA, Penning PD, Parsons AJ, Harvey A, Orr RJ (1994). Fasting affects intake behaviour and diet preference of grazing sheep. *Anim Behav*; 27: 185-193.
53. Nicol MB, Hirst JJ, Walker D, Thorburn GD (1997). Effect of alteration of maternal plasma progesterone concentrations on fetal behavioural state during late gestation. *J Endocrinol*; 152:379–386.
54. Orgeur P, Mavric N, Yvone P, Bernard S, Nowak R, Schaal B, Levy F (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and

- immuno-pathological indicators of welfare. *Appl Anim Behav Sci*; 58:87-103.
55. Orgeur P, Bernard S, Naciri M, Nowak R, Schaal B, Levy F (1999). Psychobiological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reprod Nutr Dev*; 39:231-244.
 56. Orihuela A, Sánchez-Mejorada H, Toledo M (2002). Effect of short transport during di-oestrus and pro-oestrus on cortisol levels and oestrous behaviour of sheep. *J Agr Sci*; 138:93-96.
 57. Pérez-León I, Orihuela A, Lidfors L, Aguirre V (2006). Reducing mother-young separation distress by inducing ewes into oestrous at the day of weaning. *Anim Welf*; 15:383-389.
 58. Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ, Turner AJ (1988). Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol*; 94:1257–1269.
 59. Phillipps GH (1975). Structure–activity relationships in steroidal anaesthetics. *J Steroid Biochem*; 6:607–613.
 60. Piccinato CA (2008). Regulation of steroid metabolism and the hepatic transcriptome by estradiol and progesterone. Tesis de doctorado, University of Wisconsin Madison, Madison, 180p.
 61. Pluchino N, Cubeddu A, Giannini A, Merlini S, Cela V, Angioni S, Genazzani AR (2009). Progestogens and brain: An update. *Maturitas*; 62:349-355.
 62. Reddy DS, O'Malley BW, Rogawski MA (2005). Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology*; 48:14-24.
 63. Rhind SM, Reid HW, McMillen SR, Palmarini G (1998). The role of cortisol and β -endorphin in the response of the immune system to weaning in lambs. *Anim Sci*; 66:397-402.
 64. Rhen T, Cidlowski JA (2004). Steroid hormone action. En: Strauss JF, Barbieri R. Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. 5a ed. Philadelphia, ed. Elsevier, pp. 155–174.
 65. Rowell TE (1991). Till death us do part: long-lasting bonds between ewes and their daughters. *Anim Behav*; 42:681–682.
 66. Rushen J (2000). Some issues in the interpretation of behavioural responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. UK, CABI, pp. 23–42.
 67. Säkkinen H, Tverdal A, Eloranta E, Dahl E, Holand Ø, Saarela S, Ropstad E (2005). Variation of plasma protein parameters in four free-ranging reindeer herds and in captive reindeer under defined feeding conditions. *Comp Biochem Physiol*; 142:503-511.
 68. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*; 21:55-89.
 69. Schüle C., Eser D., Baghaj T.C., Nothdurfter C., Kessler J. S. and Rupprecht R. (2011). Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? *Neuroscience*, 55-77.
 70. Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE (2007). Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev*; 28:387–439.

71. Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*; 138: 32.
72. Selye H (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol*; 6:117-230.
73. Selye H (1976). *Stress in health and disease*. Boston, Ed. Butterworth, 1256p.
74. Singh M (2005). Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*; 1052:145–151.
75. 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.
76. Strauss JF (2004). The synthesis and metabolism of steroid hormones. En: Strauss JF Barbieri RL. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management*. 5a ed. Philadelphia, ed. Elsevier, pp. 125–154.
77. Strous RD, Maayan R, Weizman A (2006). The relevance of neurosteroids to clinical psychiatry: from the laboratory to the bedside. *Eur Neuropsychopharm*; 16:155–169.
78. Towle AC, Sze PY (1983). Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem*; 18:135–143.
79. Turner DM, Ransom RW, Yang SJ, Olsen RW (1989). Steroid anaesthetics and naturally occurring analogs modulate the GABA_A receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther*; 248:960–966.
80. Van de Kar LD, Blair ML (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*; 20:1–48.
81. Veissier I, Le Neindre P, Trillat G (1989a). Adaptability of calves during weaning. *Behav Biol*; 14:66–87.
82. Veissier, I, Le Neindre P, Trillat G (1989b). The use of circadian behaviour to measure adaptation of calves to changes in their environment. *Appl Anim Behav Sci*; 22:1–12.
83. Viérin M, Bouissou MF (2001). Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiol Behav*; 72:579-587.
84. Weary DM, Jasper J, Hötzel MJ (2008). Understanding weaning distress. *Appl Anim Behav Sci*; 110:24-41.
85. Wieland S, Lan NC, Mirasedeghi S, Gee KW (1991). Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5alpha-pregnan-3alpha-ol-20 one. *Brain Res*; 565:263-268.
86. Wood PJ, Gower DB (2010). Analysis of progestagens. En: Makin HLJ, Gower DB. *Steroid analysis*. 2^a. ed. Londres. Springer, pp.559-603.
87. Yen SSC (2004). Neuroendocrinology of reproduction. En: Strauss JF, Barbieri RL. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management*. 5a ed. Philadelphia. ed. Elsevier, pp. 3–73.
88. Yvore´ P, Esnault A, Besnard J (1980). Les coccidioses des petits ruminants: coccidioses ovines. *Bull Groupement Techn Vet*; 2:15–19.