

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTRÉS DEL AISLAMIENTO SOCIAL EN CORDEROS CRIADOS
ARTIFICIALMENTE O CON SUS MADRES DURANTE LA LACTANCIA**

Por

César José Deragón Silveira

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:

Dra. Lorena Lacuesta

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Juan Pablo Damián

Tercer miembro:

Dra. Liliana Criado

Cuarto miembro (Co - Tutor):

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha: 19/09/2016

Autor:

César José Deragón Silveira

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres por apoyarme siempre en este largo camino y formarme como persona. A los demás de mi familia, abuelo, tíos y primos por acompañarme siempre y ayudarme a crecer. A Solanye por estar siempre y hacer que sea una persona más feliz cada día. Del mismo modo agradecer a mis amigos y compañeros que me dejaron la facultad, por hacer que de una u otra manera estos años fueran los mejores. Por otro lado agradecer a todos los docentes que ayudaron en mi formación tanto académica como personal durante toda la carrera. Con respecto al trabajo final, quiero agradecer Juan Pablo por su ayuda durante todo el trabajo, siempre con paciencia, dedicación y profesionalismo, al igual que a Rodolfo por su ayuda y aportes que fueron fundamentales en la realización del trabajo para que saliera lo mejor posible. También agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FCE2626-ANII) por su apoyo para que se pudiera realizar el proyecto. Por último agradecer a Conrado, Guillermo, Santiago, Laura, Florencia y a los funcionarios de INIA La Estanzuela que de diferente manera ayudaron para que este trabajo se pudiera realizar.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
PAGÍNA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Vínculo madre-cría	8
1.2. Estrés y respuesta de estrés	8
1.3. Estrés del aislamiento social	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Manejo de los animales	14
4.2. Open Field Test	15
4.3. Muestras de sangre y determinación de hormonas y proteínas	15
4.4. Análisis estadísticos	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Parámetros Comportamentales	18
5.2. Parámetros Endócrinos	18
5.3. Parámetros fisiológicos	20
5.4. Parámetros bioquímicos	22
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIÓN	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	
Tabla 1: Comportamientos evaluados durante el OFT	17

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Concentración sérica de cortisol y testosterona	18
Figura 2: Frecuencia cardíaca	19
Figura 3: Frecuencia respiratoria y temperatura rectal	20
Figura 4: Concentración sérica de proteínas totales, albúmina y globulinas	22

RESUMEN

Dentro de los factores sociales, el vínculo entre la madre y su cría incide fuertemente en el desarrollo posterior de la misma. La madre es uno de los primeros vínculos sociales que tiene el cordero, siendo de gran importancia para su supervivencia y desarrollo. El objetivo de la tesis fue comparar la respuesta de estrés al aislamiento social a los ocho meses de edad de corderos criados por sus madres hasta los 75 días de vida y corderos criados artificialmente desde sus 24-36 h de vida. Se utilizaron 20 corderos de raza Ideal, de los que 10 fueron separados de sus madres y criados artificialmente (CA) con leche de oveja, y 10 criados por sus madres (CM). A los 75 días de edad se realizó el destete de los CM y las madres fueron trasladadas a un potrero donde no tenían contacto visual ni acústico con los corderos en experimentación; en ese mismo momento los corderos CA dejaron de recibir la leche ovina. Al final de la primera estación reproductiva, cuando los corderos tuvieron 8 meses de edad, fueron sometidos al open field test (OFT). En el mismo se colocó a cada animal en forma individual durante 10 min en un corral, donde no tuvieron contacto visual ni acústico con los demás corderos del grupo, ni con otros animales y tampoco con humanos. Se registraron parámetros comportamentales (intentos de escape, olfateos, inmobilizaciones, eliminaciones totales, distancia recorrida, vocalizaciones), fisiológicos (frecuencia cardíaca, respiratoria y temperatura rectal), y en las muestras de suero se determinaron los parámetros endócrinos (concentraciones séricas de cortisol y testosterona) y bioquímicos (concentración sérica de proteínas totales, globulinas y albúmina). Los parámetros endócrinos y fisiológicos no fueron afectados por el grupo. Los corderos CM presentaron más eliminaciones totales (CM: $2,9 \pm 0,5$ vs CA: $1,5 \pm 0,1$; $p=0,046$) y recorrieron mayor distancia (CM: 116 ± 11 vs CA: 90 ± 10 ; $p=0,045$) que los corderos CA; así como también presentaron mayor concentración de albúmina sérica que los CA (CM: $3,9 \pm 0,3$ vs CA: $3,8 \pm 0,3$ g/dL, respectivamente; $p=0,02$). Hubo interacción entre grupo y tiempo en proteínas totales ($p=0,01$) y globulinas ($p=0,05$). Los corderos CM tuvieron mayor concentración de proteínas totales a los 60 min ($6,5 \pm 0,1$ vs $5,9 \pm 0,1$, $p=0,007$) que los CA; mientras que los CA tuvieron mayor concentración de globulinas a los 30 min ($2,3 \pm 0,1$ vs $2,0 \pm 0,1$, $p=0,04$) respecto a los CM. En conclusión, la presencia y el vínculo con la madre durante la crianza afecta la respuesta de estrés al OFT a los ocho meses de edad. Los corderos criados con las madres se estresaron más al ser sometido al OFT que aquellos criados artificialmente.

SUMMARY

Among the social factors, the presence and the bond between the mother and her lamb bond is of fundamental importance for the subsequent development of the offspring. The mother is one of the first social bonds that the lamb establishes, remaining relevant being of great importance for their survival and development. The aim of the thesis was to compare the stress response to social isolation in lambs at eight months old of age between lambs reared by their mothers until 75 days of life and lambs artificially reared since their 24-36 h of life. In this study, 20 Polwarth rams were used, 10 of which were separated from their mothers and artificially reared (CA) with sheep's milk and 10 were raised by their mothers (CM). Weaning of CM lambs was performed when the lambs were an average 75 days of age and their. CM lambs` dams were moved to another paddock making it impossible for the lambs to have any visual or acoustic contact with their mothers by. At the same time the CA lambs stopped receiving milk. At the end of the first breeding season, when the lambs were 8 months old, they were subjected to the open field test (OFT). In such test, each animal was placed individually for 10 min in a shed, where they had no visual or acoustic contact with others lambs from their group, neither other animals nor humans. Behavioral parameters (escaping attempts, sniffs, assets, total eliminations, distance traveled, vocalizations), physiological (heart and respiratory rate and rectal temperature) were recorded and serum samples were obtained for determination of endocrine (cortisol and testosterone concentrations) and biochemical (total protein, albumin and globulins) parameters. The CM lambs had more total eliminations (CM: 2.9 ± 0.5 vs CA: 1.5 ± 0.1 ; $p = 0.046$) and traveled more distance (CM: 116 ± 11 vs. 90 ± 10 ; $p = 0.045$) than the CA lambs; and also they had higher serum albumin concentration than CA (CM: 3.9 ± 0.3 vs CA: 3.8 ± 0.3 g / dL, respectively; $p = 0.02$). There was interaction between group and time in total protein ($p = 0.01$) and globulins ($p = 0.05$). The CM lambs had higher total protein concentration at 60 min (6.5 ± 0.1 vs 5.9 ± 0.1 , $p = 0.007$) than the CA; while the CA had higher concentration of globulins at 30 min (2.3 ± 0.1 vs 2.0 ± 0.1 , $p = 0.04$) compared to CM. In conclusion, the presence and the bond with the mother affects stress response in the OFT at eight months of age. The lambs raised with mothers were more stressed when subjected to the OFT than those raised artificially.

Revisión Lingüística



Prof. Adj. Carmen Silvia Gallo Muñoz TT EPE MDL
Encargada del Área de Inglés
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vínculo madre-cría

Dentro de los vínculos sociales en ovinos, la madre es el primero que tiene el neonato (Lévy y Keller, 2008). El vínculo con la madre es de gran importancia para la supervivencia y el desarrollo del cordero (Poindron y Le Neindre, 1980). La madre le provee alimento, calor, refugio y protección frente a los depredadores y también influye en el desarrollo fisiológico, sensorial, emocional y social de los recién nacidos (Lévy y Keller, 2008). En ovinos, a las pocas horas del nacimiento se desarrolla una relación fuerte y selectiva entre la madre y el cordero (Poindron y Le Neindre, 1980). El vínculo entre la madre y su descendencia masculina, puede determinar alteraciones irreversibles, tanto en el ámbito social como sexual de los mismos (Kendrick et al., 1998). Como ejemplo de ello, Kendrick et al. (1998) reportó que los corderos que fueron criados por cabras, de adultos prefirieron montar a cabras más que a ovejas. Por lo tanto, el vínculo social entre la madre y la cría repercute sobre la vida social y sexual futura del cordero.

Como factor social es importante la presencia de la madre durante la primera etapa de vida del cordero. La ausencia de la madre afecta la respuesta de estrés durante el desarrollo y la etapa adulta de los corderos. El vínculo establecido entre la madre y su cordero puede persistir más allá del destete natural de la cría, la ruptura del vínculo es considerado como un estresor para ambos (Morgan y Arnold, 1974; Alexander, 1977; Napolitano et al., 2008). Son varios los factores que inciden en el estrés del destete en corderos; ya que incluye componentes sociales (la separación de su madre y la reagrupación con nuevos compañeros), cambios nutricionales (el dejar de consumir leche y pasar a una dieta sólida) y el final del acceso a la ubre y la conducta de lactancia (Napolitano et al., 2008; Weary et al., 2008). Dentro de todos los factores estresantes durante el destete, Damián et al. (2013) observaron que la pérdida de la madre es un factor central en la respuesta de estrés de los corderos, la que se manifiesta principalmente por el aumento de las frecuencias de vocalizaciones y de costear. Estos comportamientos son realizados principalmente con el objetivo de buscar a las madres, evidenciando que la pérdida de estas causa en los corderos una importante respuesta de estrés (Napolitano et al., 2008; Newberry y Swanson, 2008; Damián et al., 2013).

1.2 Estrés y respuesta de estrés

El estrés se puede definir como el estado de desequilibrio homeostático (Pacák y Palkovits, 2001; Sapolsky, 2004) desencadenado por factores conocidos como “estresores” (Sapolsky, 2004; Earley et al., 2010). Los estresores pueden clasificarse de acuerdo a como actúan, en dos tipos: estresores físicos (temperaturas extremas, ruidos, vibraciones, dolor y agentes químicos como venenos, ejercicio, falta de agua y/o alimento, shock eléctrico, dolor, hemorragias) y psico-sociales (ansiedad, miedo o frustración en relación a cambios en su entorno social, sea por ejemplo por aislamiento social o jerarquía) (Ewing et al., 1999; Earley et al., 2010). Otra manera de clasificar a los estresores es de acuerdo a la duración del efecto, y se dividen en estresores agudos o crónicos. Los agudos son de exposición simple, intermitente y de corta duración en el tiempo; mientras que los crónicos

involucran una exposición prolongada, ya sea de forma continua o intermitente (Pacák y Palkovits, 2001).

Cuando el estresor es percibido se desencadena la respuesta de estrés, involucrando la activación del eje simpático-adrenomedular (SAM), por el que el sistema nervioso autónomo (la rama simpática) estimula a la médula de la glándula adrenal a secretar las catecolaminas adrenalina y noradrenalina (Sapolsky, 2004; Earley et al., 2010). Estas catecolaminas estimulan los receptores α , β_1 y β_2 adrenérgicos, lo que provoca un incremento en la frecuencia respiratoria y cardíaca, midriasis y glucogenolisis; todo lo que prepara al animal para una respuesta inmediata frente a un estresor agudo (Earley et al., 2010). El otro eje que se activa durante la respuesta de estrés es el hipotálamo-hipófiso-adrenocortical (HHA) (Selye, 1936). El eje HHA involucra las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, las que secretan el factor liberador de corticotropina (CRH), el que estimula a la adenohipófisis a secretar adenocorticotropina (ACTH) (Anisman et al., 1997; Pacák y Palkovits, 2001; Earley et al., 2010). La ACTH liberada a la circulación sistémica estimula a la corteza adrenal a liberar glucocorticoides (Anisman et al., 1997; Earley et al., 2010), los que estimulan la movilización de reservas mediante la lipólisis y la glucogenolisis, y activan la gluconeogénesis (Pacák y Palkovits, 2001; Earley et al., 2010). El estímulo de todas estas vías metabólicas en conjunto, tanto del eje SAM como del HHA, proporcionan energía para que el organismo pueda responder a la emergencia generada por el estresor (Ewing et al., 1999). Si la respuesta de estrés fue efectiva, el animal logra superar la situación inducida por el estresor y restablecer la homeostasis a su función normal (Damián y Ungerfeld, 2013). Sin embargo, dependiendo de la intensidad y duración del estresor, la respuesta puede ser insuficiente afectando las funciones biológicas hasta niveles patológicos (Damián y Ungerfeld, 2013).

Diversas prácticas que son usadas frecuentemente en la producción, pueden actuar como estresores y por tanto generar respuestas de estrés en los animales. Ejemplo de estas prácticas son: la castración, el corte de cola, aislamiento social y/o exposición a un nuevo ambiente, la identificación con caravanas, transporte, hacinamiento en producciones intensivas (Forkman et al., 2007; Damián y Ungerfeld, 2013), esquila y la utilización de perros en el trabajo con ovinos (Hargreaves y Hutson, 1990; Komesaroff et al., 1998; Carcangiu et al., 2008).

El estrés en producción animal puede ser un indicador de pobre bienestar animal y afectar negativamente la reproducción, la producción y la salud (Damián y Ungerfeld, 2013). A nivel reproductivo la respuesta de estrés provoca una disminución o bloqueo del comportamiento del celo en la hembra y de la libido en el macho (Knight et al., 1988; Ehnert y Moberg, 1991). El estrés agudo en corderos y/o carneros (por aislamiento, transporte, temperaturas extremas, electroyacuación) afecta negativamente la calidad seminal y la secreción de testosterona (Apple et al., 1993; Nazifi et al., 2003; Al-Qarawi y Ali, 2005; Ali et al., 2006; Damián y Ungerfeld, 2011). El estrés del transporte, confinamiento y destete incrementan la parasitosis en ovinos (Watson, 1991; Sotiraki et al., 1999). En ovinos, estresores como el hacinamiento, el maltrato físico hacia los animales y la contaminación ambiental provocan disminución en la producción de leche (Sevi et al., 1999; 2009). Desde el punto de vista

sanitario, el estrés crónico produce inmunosupresión, aumentando el riesgo de contraer infecciones (Anisman et al., 1997; Sapolsky, 2002; Earley et al., 2010; Damián y Ungerfeld, 2013).

1.3 Estrés del aislamiento social

Dado que los ovinos son animales muy sociales y sumamente gregarios, el hecho de separarlos de su grupo social y aislarlos provoca una gran respuesta de estrés (Moberg et al., 1976; Lynch et al., 1992; Bouissou et al., 2001; Forkman, 2007). El estrés del aislamiento social fue en primera instancia evaluado en roedores mediante la prueba conocida como "Open Field Test" (OFT) (Hall, 1934, 1936); posteriormente, esta prueba se validó en varias especies productivas, incluida la ovina (Forkman, 2007).

La prueba OFT permite evaluar como los animales reaccionan frente al aislamiento social. El OFT consiste en encerrar al animal en un corral en forma individual, sin contacto visual ni auditivo con sus compañeros por algunos minutos (Forkman, 2007). La respuesta de estrés al OFT en ovinos genera cambios en indicadores fisiológicos (incremento de la frecuencia cardíaca y respiratoria y de la temperatura rectal), indicadores hormonales (incremento de cortisol, ACTH, catecolaminas, vasopresina, prolactina, oxitocina), indicadores bioquímicos (glucemia, proteínas totales, hematocrito) y despliegue de algunos comportamientos específicos (Damián y Ungerfeld, 2013). Dentro de los comportamientos evaluados, aquellos animales que presentan un incremento en los movimientos de locomoción, vocalizaciones, defecaciones y micciones son indicativos de una mayor respuesta de estrés al aislamiento social (Boissy y Le Neindre, 1997; Goddard et al., 2000; Forkman et al., 2007). El incremento de los movimientos de locomoción y vocalizaciones refleja miedo y/o estrés, por la ausencia de sus pares o compañeros y por investigación al estar en un ambiente desconocido; defecar y orinar son interpretados como signos de estrés y se dan por la activación del sistema nervioso autónomo en respuesta al estresor (Forkman et al., 2007).

En este trabajo se utilizaron dos grupos de animales en los que el tratamiento fue haber sido criados con las madres o artificialmente durante la lactancia. Otros autores como Vandenheede et al. (1993) y Romeyer et al. (1992) evaluaron en ovinos el efecto de la crianza con la madre o artificialmente sobre la respuesta de miedo o estrés cuando se someten a pruebas de miedo (OFT, presencia de un ser humano, presencia de un objeto nuevo). Vandenheede et al. (1993) concluyó que carneros criados con sus madres presentan mayor respuesta estrés cuando se sometieron a pruebas de miedo a los ocho meses de edad que aquellos criados artificialmente. En el mismo sentido, Romeyer (1992) reportó que ovejas (de entre 5 y 22 meses de edad) que fueron criadas con sus madres son más temerosas que aquellas criadas artificialmente, cuando se someten a pruebas de miedo. En los trabajos de Vandenheede et al. (1993) y Romeyer et al. (1992) los corderos CM recibieron leche hasta los 90-100 días, mientras que el grupo CA se les dejó de alimentar artificialmente a los 45 días de edad. En base a lo expresado anteriormente, debido a que los trabajos de Romeyer et al. (1992) y Vandenheede et al. (1993) no consideraron algunas posibles diferencias como el de la alimentación, lo cual confunde el efecto de la cría con la madre con las

diferencias de alimentación y peso de los corderos. Por lo tanto, en nuestro trabajo se plantea estudiar el efecto de la presencia y vínculo con la madre durante la crianza sobre la respuesta de estrés de los corderos, controlando aspectos como la alimentación, el grupo social y el peso entre ambos grupos. Por otra parte teniendo en cuenta que los corderos se diferenciaron en aspectos sociales como la presencia o no de la madre durante la crianza, es interesante evaluar cómo responden frente a un estresor social como es el OFT, el cual no es invasivo y tiene la ventaja de permitir evaluar la respuesta comportamental y además indicadores fisiológicos, bioquímicos y endócrinos.

2. HIPÓTESIS

Los corderos que fueron criados artificialmente se estresan menos al ser sometidos al OFT a los ocho meses de edad que los corderos que fueron criados por sus madres.

3. OBJETIVO

Comparar la respuesta de estrés al aislamiento social a los ocho meses de edad, en corderos criados por sus madres hasta los setenta y cinco días de vida y corderos criados artificialmente desde las 24-36 h de vida.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Manejo de los animales

El trabajo de campo se realizó en la Unidad de Ovinos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental “La Estanzuela” (Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay). Se trabajó con 20 corderos machos de raza Ideal, los que nacieron en el mes de setiembre de 2011. Las madres de dichos corderos fueron cruzadas con 3 carneros de la misma raza. Todos los corderos nacieron en parto único, con un máximo de 12 días de diferencia entre ellos.

Las ovejas gestantes fueron mantenidas en un mismo potrero bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. Se formaron dos grupos experimentales de corderos de forma homogénea de acuerdo al día de nacimiento y al peso. Identificándose como: corderos criados artificialmente (CA, n=10), los cuales fueron separados de las madres a las 24-36 horas después de nacidos. Corderos criados por las madres (CM, n=10), los cuales permanecieron con las mismas hasta los 75 días de vida.

Los corderos CA fueron alimentados a través de tetinas artificiales con leche proveniente del ordeño de las madres o de otras ovejas. La cantidad de leche y frecuencia de administración se ajustó para mantener un peso corporal similar al de los corderos CM. Durante los primeros 7 días de vida se les suministró 0,5-0,7 L dividido en 6 tomas diarias, a las 8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 8 al 15 se les dio 0,8-1 L dividido en 4 tomas diarias a las 8:00 h, 12:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 16 hasta el día de destete se les suministró 3 tomas diarias 8:00 h, 12:00 h y 19:00 h. A partir del día 16 hasta el día 30 se les suministró 1,0-1,3 L, y desde el día 31 hasta el día 75, se les dio 1,4-1,6 L en 2 tomas diarias.

Durante la alimentación, los corderos CA tuvieron el mínimo contacto necesario con los seres humanos. Todos los corderos fueron pesados cada 7-15 días. Para reducir las diferencias en las relaciones sociales que podrían incidir en el proceso de aprendizaje, en el potrero de los corderos CA se incluyó 4 ovejas adultas que tenían corderos de edad similar a los corderos experimentales.

Durante los primeros 15 días de vida, todos los corderos se alojaron en dos corrales cerrados durante la noche, con una temperatura ambiente de 20 a 23°C. A partir de los 15 días, los dos grupos se manejaron en diferentes potreros de 25x50 m cada uno. Los corderos tenían libre acceso a sombra artificial hecha con una tela de sombra con el apoyo de un cuadrante de hierro (área=4,5 m², altura=0,8 m).

El destete se realizó cuando los corderos tenían en promedio 75 días de vida (entre 69 y 81 días de edad). Las madres de los corderos CM y las 4 ovejas con corderos alojadas en el potrero de los corderos CA fueron trasladadas a otro potrero donde no tenían contacto visual ni acústico con los corderos en experimentación. En ese mismo momento los corderos CA dejaron de recibir la leche ovina.

Luego del destete ambos grupos fueron mantenidos en potreros separados de iguales características, con pasturas mejoradas. Se les suministró ración dos veces al día y fardos de alfalfa *ad libitum*.

4.2 Open Field Test

El OFT se realizó cuando los corderos tuvieron 8 meses de edad, coincidiendo con el final del otoño. Los corderos se sometieron al OFT en forma alterna, y aleatoria dentro de cada grupo. Los animales fueron llevados de forma tranquila al corral de estudio, que se encontraba alejado de los potreros donde vivían. El test consistió en colocar a cada animal durante 10 min en un corral de 3,5 X 3 m, con paredes de 2 m de alto, lo que les impedía ver hacia el exterior. A su vez, en el piso del mismo se pintó con tiza una cuadrícula de 36 rectángulos para evaluar el desplazamiento de los animales durante el test, lo que se calculó de acuerdo al número de líneas atravesadas por los mismos.

Los eventos de comportamiento durante el test fueron grabados con dos cámaras de video (Sony DRC-SR85, China). Los comportamientos registrados y que posteriormente se evaluaron fueron: actividad locomotora (número de líneas cruzadas), intentos de escape (golpes con la cabeza y miembros delanteros sobre los costados del corral, y postura erguida sobre sus patas traseras, al mismo tiempo que sus miembros delanteros los mantenía apoyados sobre las paredes del corral), comportamiento de eliminación (número de defecaciones y micciones, y tiempo a la primera defecación y micción), exploración (número de olfateos en cualquier sitio del corral), vocalización (número de vocalizaciones), número de inmobilizaciones (el animal parado sin realizar vocalizaciones, defecaciones ni micciones, y sin manifestación de olfateo).

Se registró la frecuencia cardiaca de forma continua mediante un cardio tacómetro (Polar FS3, EEUU) en la zona de proyección cardíaca; y se tomó los tiempos 0, 10 y 20 para hacer el análisis estadístico. Además se registró la temperatura rectal (termómetro digital) y la frecuencia respiratoria (observación de los movimientos costo-abdominales) antes de comenzar el OFT (tiempo 0) y a los 10 min de realizado el mismo.

4.3 Muestras de sangre y determinación de hormonas y proteínas

Determinación de hormonas

Para determinar la concentración de cortisol, se tomaron muestras de sangre mediante venopunción yugular, 10 min antes del OFT (-10), inmediatamente antes de ingresar al test (0), y a los 10, 20, 30, 45, 60 y 90 min después del mismo; y para determinar la concentración de testosterona, se usaron las muestras correspondientes a los tiempos 0, 10, 30, 60 y 90 min. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min para separar el suero, el que fue almacenado a -20°C hasta la determinación hormonal. Las concentraciones séricas de cortisol y testosterona se midieron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, mediante radioinmunoanálisis (RIA), utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, Los Ángeles, CA, EEUU). Los coeficientes de

variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron para cortisol menores al 8% y la sensibilidad fue de 8,1 nmol/L y para testosterona los coeficientes de variación fueron menores al 6% y la sensibilidad fue de 0,14 nmol/L.

Determinación de la concentración sérica de proteínas

Para la determinación de la concentración sérica de proteínas se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción yugular, tomadas inmediatamente antes de ingresar al OFT (0), y a los 30, 60 y 90 min después del OFT. Las mismas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min para obtener suero, el que fue almacenado a -20°C hasta la determinación de las proteínas. En el laboratorio de Bioquímica y de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria se determinaron las concentraciones de proteínas totales (técnica de Biuret), albúmina (Kit Biosystem) y globulinas, cuya concentración se estimó a partir de los resultados obtenidos para proteínas totales y albumina.

4.4 Análisis estadísticos

Las variables de comportamiento fueron comparadas por el test U de Mann Whitney. Las concentraciones séricas de cortisol y testosterona fueron comparadas entre ambos grupos por ANOVA para medidas repetidas, donde se incluyó el efecto del grupo (CA vs CM), del tiempo y la interacción entre ambos. En el análisis de los parámetros bioquímicos (proteínas totales, globulinas y albúmina) los datos iniciales (tiempo 0) fueron incluidos como covariable en el modelo. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

5. RESULTADOS

5.1. Parámetros Comportamentales

Los corderos CM presentaron más eliminaciones totales y recorrieron más distancia que los corderos CA (Tabla 1). No se observaron diferencias en los restantes comportamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Comportamientos (media \pm EEM) registrados durante el OFT en corderos que fueron criados con sus madre (CM) y en corderos criados artificialmente (CA).

Comportamiento	CM	CA	P
Intentos de escape	6,7 \pm 2,5	6,6 \pm 2,0	ns
Olfateos	21,6 \pm 2,1	23,8 \pm 2,5	ns
Inmovilizaciones	7,1 \pm 1,7	7,4 \pm 1,1	ns
Eliminaciones totales	2,9 \pm 0,5	1,5 \pm 0,1	0,046
Distancia recorrida	116,0 \pm 11,0	90,0 \pm 10,0	0,045
Vocalizaciones	22,0 \pm 8,0	23,0 \pm 4,0	ns

ns: $P > 0,05$

5.2 Parámetros endócrinos

Cortisol

No hubo efecto grupo, ni interacción entre grupo y tiempo en la concentración sérica de cortisol. El tiempo afectó la concentración sérica de cortisol ($p < 0,0001$): la concentración basal de cortisol aumentó desde los -10 min a su valor máximo a los 10 min del test ($p < 0,0001$); luego la concentración disminuyó hacia los 30 min ($p < 0,0001$) y se mantuvo en valores basales hasta los 90 min (Figura 1A).

Testosterona

No hubo efecto grupo, tiempo, ni interacción entre grupo y tiempo en la concentración sérica de testosterona (Figura 1B).

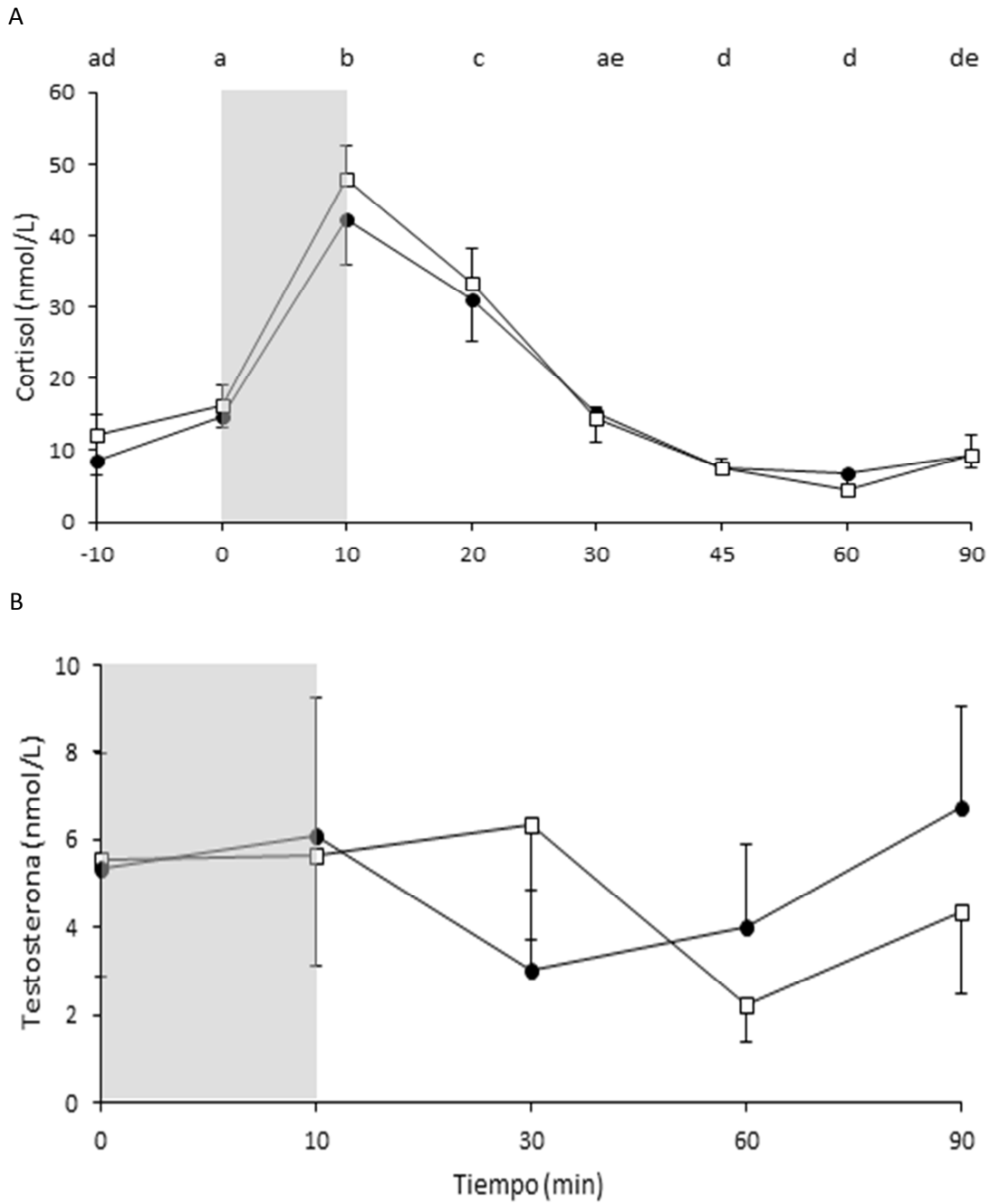


Figura 1. Concentración sérica de cortisol y testosterona desde 10 min antes (-10) hasta los 90 min posteriores del OFT en corderos criados artificialmente (CA \square) o con sus madres (CM \bullet). El espacio sombreado corresponde al tiempo en el que los animales estuvieron en el OFT. Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$

5.3 Parámetros fisiológicos

Frecuencia Cardíaca

No hubo efecto grupo, ni interacción entre grupo y tiempo en la frecuencia cardíaca. La frecuencia cardíaca varió a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$): aumentó desde el tiempo 0 y llegó a su máximo a los 10 min ($p < 0,001$), posteriormente disminuyó desde los 10 min a los 20 min ($p < 0,0001$) sin tomar los valores basales ($p = 0,01$) (Figura 2).

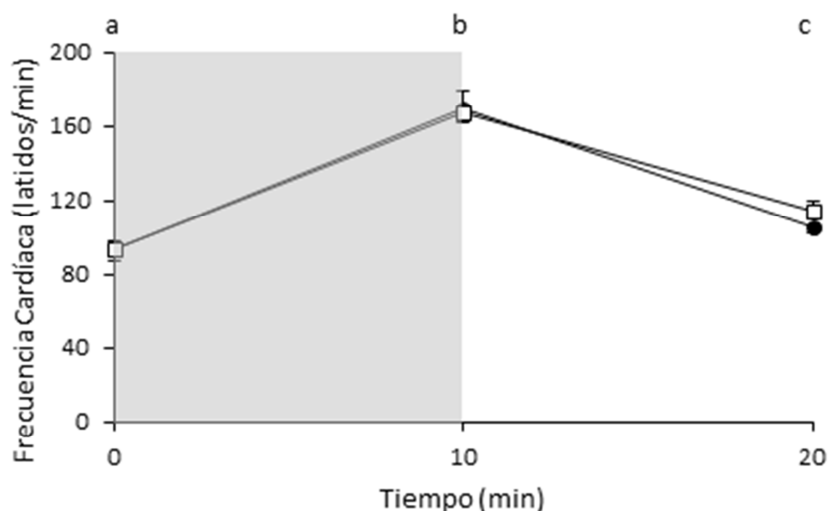


Figura 2. Frecuencia cardíaca desde el tiempo 0 al 20 posteriores al OFT en corderos criados artificialmente (CA —□—) o con sus madres (CM —●—). El espacio sombreado corresponde al tiempo en el cual los animales estuvieron en el OFT. Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$.

Frecuencia Respiratoria

No hubo efecto grupo, ni interacción entre grupo y tiempo en la frecuencia respiratoria. La frecuencia respiratoria tendió a aumentar desde el tiempo 0 al tiempo 10 min ($p = 0,07$) (figura 3A).

Temperatura Rectal

No hubo efecto grupo, ni interacción entre grupo y tiempo en la temperatura rectal. La misma varió a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$), incrementándose desde los 0 a los 10 min ($p < 0,0001$) (Figura 3B).

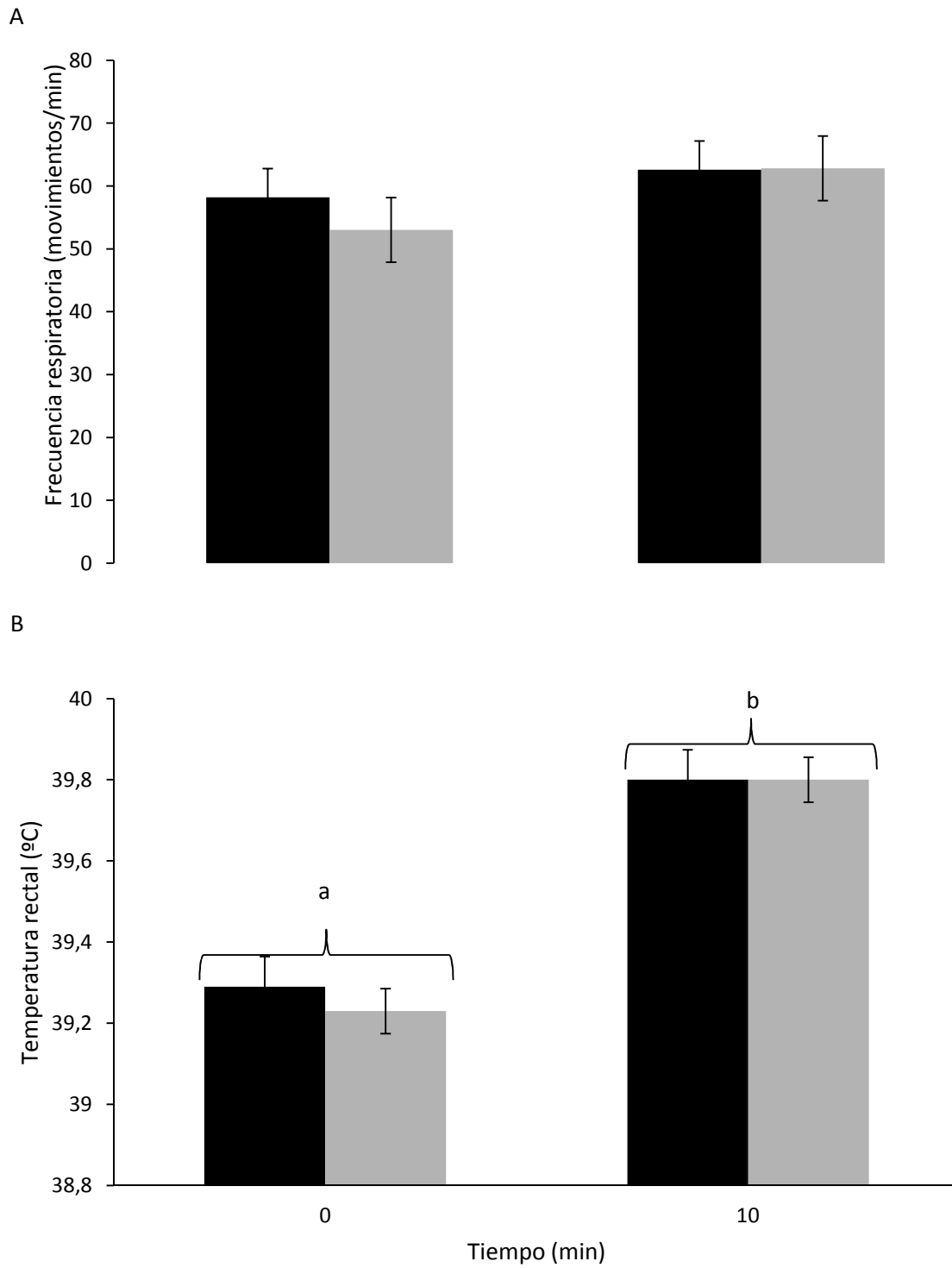


Figura 3. Frecuencia respiratoria (A) y temperatura rectal (B) inmediatamente antes (0 min) e inmediatamente después (10 min) al OFT de corderos criados artificialmente (CA: barras negras) o con sus madres (CM: barras grises). Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$.

5.4 Parámetros bioquímicos

Proteínas séricas totales

Las proteínas séricas totales no fueron diferentes entre los grupos. Hubo interacción entre grupo y tiempo ($p=0,01$) en la concentración de proteínas totales: los corderos CM tuvieron mayor concentración de proteínas totales que los corderos CA a los 60 min ($p=0,01$). La concentración de proteínas séricas totales varió a lo largo del tiempo ($p<0,04$): la misma disminuyó desde los 60 a los 90 min ($p=0,005$) (Figura 4A).

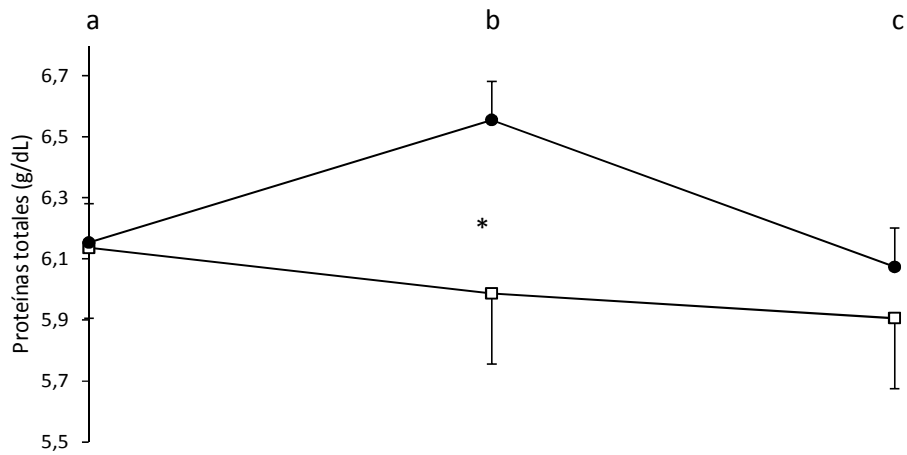
Globulinas

No hubo efecto grupo ni efecto tiempo en la concentración de globulinas sérica, aunque si hubo una interacción entre grupo y tiempo ($p=0,05$): los CA tuvieron mayor concentración de globulinas que los CM a los 30 min ($p=0,04$) (Figura 4B).

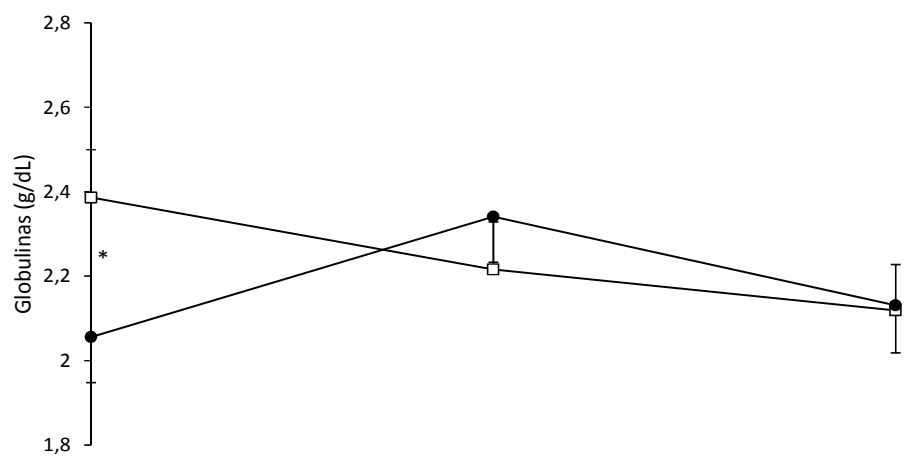
Albúmina

Hubo efecto grupo ($p=0,02$) e interacción entre grupo y tiempo ($p=0,01$) en la concentración de albúmina sérica y no hubo efecto tiempo. Los CM presentaron mayor concentración que los CA a los 30 ($p=0,05$) y 60 min ($p=0,003$) (Figura 4C).

A



B



C

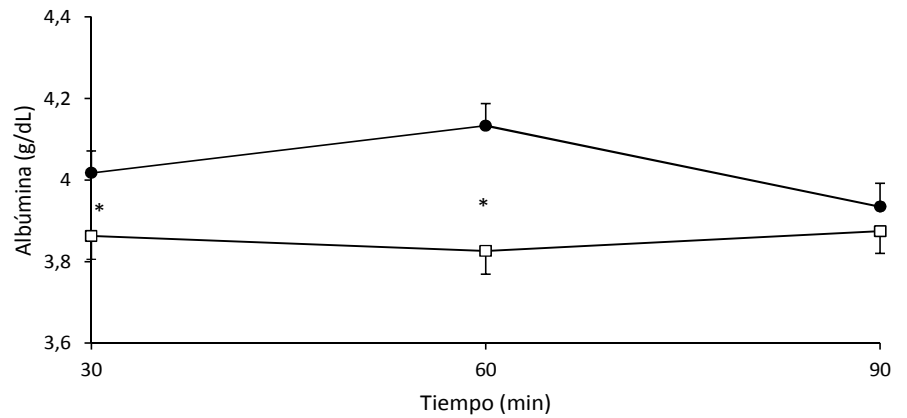


Figura 4. Concentración sérica de proteínas totales, albúmina y globulinas desde el tiempo 30 al 90 posteriores al OFT en corderos criados artificialmente (CA —□—) o con sus madres (CM —●—). Diferentes letras entre tiempos difieren $p < 0,05$. Diferencias entre grupos para un mismo tiempo se indicada como: * $p < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

Se demostró que los corderos responden de manera diferente al OFT de acuerdo a la presencia y/o vínculo que tuvieron con su madre durante la etapa de lactancia. De acuerdo con la hipótesis propuesta, los animales CM se estresaron más al ser sometidos al OFT que los animales CA, lo que fue evidenciado por parámetros comportamentales (mayor frecuencia de eliminaciones totales y mayor distancia recorrida) y bioquímicos (aumento en la concentración de proteínas totales, albúmina y disminución en globulinas). En otros trabajos como el de Romeyer et al. (1992) afirmaron que durante la crianza los corderos CA tienen más contacto con los humanos que los CM hasta el destete, lo que afecta la respuesta de estrés de los animales siendo menos temerosos al OFT (Vandenhede et al. 1993). Nuestros resultados van en la misma dirección que los obtenidos por Romeyer et al. (1992) y Vandenhede et al. (1993), aunque consideramos que nuestro trabajo presenta algunas fortalezas desde el punto de vista del diseño experimental. Por ejemplo, durante la crianza se consideró aspectos importantes, como la alimentación (ambos grupos recibieron leche ovina hasta los 75 días de edad), se evitaron diferencias de peso y se tuvo en cuenta el grupo social (se colocaron ovejas con crías de edades similares a los corderos CA). Está claro que el vínculo social con la madre durante la crianza afecta aspectos sociales a lo largo de la vida del individuo, como se demostró que los corderos CM se estresan más frente al estrés de aislamiento social que los CA.

Se observó que los animales de ambos grupos respondieron al OFT incrementando las concentraciones séricas de cortisol en forma similar. Sin embargo, dado que el incremento del cortisol ocasiona el aumento de proteínas séricas y suprime el sistema inmune (Sapolsky, 2004; Damián y Ungerfeld, 2013), es posible especular que aunque no se encontraron diferencias entre grupos en la concentración de cortisol, los animales de ambos grupos respondieron en forma distinta a un incremento similar de cortisol. Los corderos CM presentaron mayor concentración sérica en proteínas totales y albuminas y menor concentración de globulinas que los CA. Considerando que las inmunoglobulinas son parte de las globulinas séricas, se puede sugerir que los corderos CM presentaron mayor supresión del sistema inmune por el estrés del OFT que los CA.

Se cuantificaron las concentraciones séricas de cortisol, pero no las concentraciones séricas de catecolaminas. Si bien, no se encontraron diferencias en la frecuencia cardíaca como indicador de la activación del eje SAM, si se encontraron diferencias en los comportamientos de eliminaciones (defecaciones y micciones), los cuales están asociados con la activación de la rama simpática del sistema nervioso autónomo (Sapolsky, 2004; Earley et al., 2010). Por lo tanto, se puede sugerir que las diferencias observadas en los comportamientos de eliminaciones entre corderos CM y CA, podrían resultar en diferencias de la respuesta del eje SAM al estrés del aislamiento social en corderos.

Las diferencias en la respuesta de estrés al aislamiento social se observaron en algunas variables comportamentales y bioquímicas, pero no en los parámetros endócrinos (testosterona, cortisol), o de existir, las endócrinas

no pudieron ser detectadas. La síntesis de testosterona no fue afectada por el tipo de crianza que tuvieron los corderos, lo cual coincide con lo reportado por Illius et al. (1976), quienes concluyeron que el método de crianza (criados naturalmente o artificialmente) no modifica el patrón de secreción de testosterona hasta los 21 meses de edad. Corresponde aclarar que el trabajo de Illius et al. (1976) evaluaron las concentraciones basales de testosterona a lo largo del desarrollo de los corderos y en nuestro trabajo se evaluó la secreción de testosterona en un momento dado frente a un estresor social. En ambos grupos de corderos (criados naturalmente o artificialmente) no se encontraron diferencias y los mismos mantuvieron la concentración de testosterona constante en los tiempos que fueron tomadas las muestras. Por lo que es posible especular que el OFT como estresor social no generó una respuesta aguda a nivel del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal capaz de afectar la secreción de LH, de forma que repercutiera a nivel testicular con una menor producción de testosterona.

7. CONCLUSIÓN

Se concluyó que la presencia y el vínculo con la madre durante la crianza afectó la respuesta de estrés al OFT a los ocho meses de edad. Los corderos criados con las madres se estresaron más al ser sometido al OFT que aquellos criados artificialmente.

8. BIBLIOGRAFÍA

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.

Ali B.H., Al-Qarawi A.A., Mousa H.M. (2006). Stress associated with road transportation in desert sheep and goats, and the effect of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Res Vet Sci* 80:343–348.

Al-Qarawi A.A., Ali B.H. (2005) Isolation stress in desert sheep and goats and influence of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Vet Res Commun* 29: 81–90.

Anisman H., Zaharia M., Meaney M., Merali Z. (1997). Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* 16:149-164.

Apple J.K., Minton J.E., Parsons K.M., Unruh J.A, (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.

Boissy A., Le Neindre P. (1997). Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiol Behav* 61: 693-699.

Bouissou M.F., Boissy A., Le Neindre P., Veissier I. (2001). The social behaviour of cattle. En: Keeling L, Gonyou H (ed). *Social behaviour in farm animals*. Wallingford, CABI; pp. 113–45.

Carcangiu V., Vacca G.M., Parmeggiani A., Mura M.C., Pazzola M., Dettori M.L., Bini P. (2008). The effect of shearing procedures on blood levels of growth hormone, cortisol and other stress haematochemical parameters in Sarda sheep. *Animal* 2: 606-612.

Damián J.P., Hötzel M.J., Banchemo 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.

Damián J.P., Ungerfeld R. (2011). The stress response of frequently electro ejaculated rams to electro ejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod Dom Anim* 46:646–650.

Damián J.P., Ungerfeld R. (2013). Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Arch Latinoam Prod Anim* 21:103-113.

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.

Ehnert, K., Moberg, G.P. (1991). Disruption of oestrous behaviour in ewes by dexamethasone or management-related stress. *J Anim Sci* 69:2988–2994.

Ewing S.A., Lay Jr.D.C., von Borell E. (1999). *Farm animal well-being: stress physiology, animal behavior, and environmental design*. Upper Saddle River, Prentice Hall, 357 p.

Forkman, B., A., Boissy, M., C., Salaün, E., Canali, R.B., Jones. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol Behav* 92:340–374.

Goddard P.J., Fawcett A.R., MacDonald A.J., Reid H.W. (2000). The behavioural, physiological and immunological responses of lambs from two rearing systems and two genotypes to exposure to humans. *Appl Anim Behav Sci* 66:305-321.

Hall C.S. (1934). Emotional behaviour in the rat: I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18:385–403.

Hall C.S. (1936). Emotional behaviour in the rat: III The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Psychol* 22:345–52-352.

Hargreaves, A.L., G.D. Hutson. (1990). The effect of gentling on heart rate, flight distance and aversion of sheep to a handling procedure. *Appl Anim Behav Sci* 26:243-252.

Hargreaves, A.L., G.D. Hutson. (1990). The stress response in sheep during routine handling procedures. *Appl Anim Behav Sci* 26:83-90.

Illius A W, Haynes N B, Purvis K, Lamming G E. (1976). Plasma concentrations of testosterone in the developing ram in different social environments. *J Reprod Fertil*, 48(1):17-24.

Kendrick K.M., Hinton M.R., Atkins K. (1998). Mothers determine sexual preferences. *Nature*, 395:229-230.

Knight T.W., Hal D.R.H., Lynch P.R., Hockey H.U.P. (1988). Effects of pre-joining shearing, stress, pasture allowance, and haemoglobin type on reproductive performance of Romney and Marshall Romney ewes. *New Zeal J Agr Res* 31:249-258.

Komesaroff A., Esler M., Clarke I.J., Fullerton M.J., Funder J.W. (1998). Effects of estrogen and cycle on glucocorticoid and catecholamine responses to stress in sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275:671-678.

Lévy F., Keller M. (2008). Neurobiology of Maternal Behavior in Sheep. En: Brockmann J., Roper T., Naguib M., Wynne-Edwards K., Barnard C., Mitani J. *Advances in the Study of Behavior*. Amsterdam, Elsevier, pp 399-437.

Lynch J.J., Hinch G.N., Adams D.B. (1992). *The Behaviour of Sheep. Biological principles and Implications for Production*. Wallingford, CAB International, 237 p.

Moberg G.P., Wood V.A. (1976). Ontogeny of emotional responsiveness in lambs: Effect of maternal deprivation on open-field behavior and circulating corticosteroids. *Neurosci Abstr* 2:319.

Morgan, P.D., Arnold, G.W. (1974). Behavioural relationships between merino ewes and lambs during the four weeks after birth. *Anim Prod* 19:169-176.

Napolitano F., De Rosa G., Sevi, A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 110: 58–72.

Nazifi S, Saeb M, Rowghani E, Kaveh K. (2003). The influences of thermal stress on serum biochemical parameters of Iranian fat-tailed sheep and their correlation with triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and cortisol concentrations. *Comp Clin Path* 12:135–139.

Newberry, R.C., Swanson, J.C. (2008). Implications of breaking mother–young social bonds. *Appl Anim Behav Sci* 110:3–23.

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

Poindron P., Le Neindre P. (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behaviour in the ewe. *Adv Stud Behav*, 11: 76-119.

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

Sapolsky R.M. (2002). Endocrinology of the stress-response. En: Becker J.B., Breedlove S.M., Crews D, McCarthy M.M. *Behavioral endocrinology*. 2^a ed. Cambridge, Mit, p. 409-450.

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

Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.

Sevi A., Casamassima D., Pulina G., Pazzona, A. (2009). Factors of welfare reduction in dairy sheep and goats. *Ital J Anim Sci* 8:81-101.

Sevi A., Mass S., Annicchiarico G., Dell’Aquila S., Muscio A. (1999). Effect of stocking density on ewes’ milk yield, udder health and microenvironment. *J Dairy Res* 66:489-499.

Sotiraki S.T., Leontides L.S., Himonas C.A. (1999). The effect of transportation and confinement stress on egg production by *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *J Helminthol* 73:337-339.

Vandenheede M.I., Bouissou M.F. (1993). Sex differences in fear reactions in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 37:39-55.

Watson D.L. (1991). Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Res Vet Sci* 51:128-132.

Weary, D.M., Jasper, J., Hötzel, M.J. (2008). Understanding weaning distress. *Appl Anim Behav Sci* 110:24–41.