

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA SOBRE LA RESPUESTA
FISIOLÓGICA Y COMPORTAMENTAL DE ESTRÉS AL DESTETE TEMPRANO
EN OVEJAS EN ANESTRO**

por

Patricia ABRAHAM

Josefina TOURON

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
2014**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Roberto Kremer

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Aline Freitas de Melo

Tercer miembro:

Dr. Fernando Perdigón

Cuarto miembro:

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha

7 de Febrero de 2014.

Autores:

Br. Patricia Abraham

Br. Josefina Touron

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
Introducción	10
Revisión bibliográfica	11
Destete.....	11
Estrés.....	12
Estrés y estresores.....	12
Respuesta simpática y neuroendócrina a estresores	12
Indicadores de estrés	13
Progesterona.....	13
Metabolización de la progesterona.....	13
Progesterona y producción de leche	15
Producción y composición de la leche.....	15
CIDR	17
Hipótesis	18
Objetivos	19
General	19
Materiales y Métodos	20
Local de estudio, animales y manejo.....	20
Experimento I: Tratamiento de progesterona y producción y composición de la leche	20

Animales y tratamiento	20
Producción de leche.....	20
Composición química de la leche	20
Experimento II: Tratamiento con progesterona y respuesta al estrés del destete temprano.....	21
Animales, manejo y tratamiento	21
Observaciones de comportamiento	21
Muestras de sangre.....	22
Cambios fisiológicos.....	22
Niveles de progesterona	22
Peso de los corderos.....	23
Análisis estadístico.....	23
Resultados	24
Experimento I: Tratamiento de progesterona y producción y composición de la leche.	24
Producción de leche.....	24
Composición de la leche	25
Experimento II: Tratamiento con progesterona y respuesta al estrés del destete temprano.....	26
Determinación de las concentraciones de progesterona sérica durante el tratamiento con CIDR.....	26
Peso de los corderos.....	27
Registros comportamentales.....	28
Proteínas séricas	31
Discusión	33
Conclusión	35
Bibliografía	36

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Comportamientos registrados en las ovejas para evaluar los cambios comportamentales al destete.....	22
Cuadro 2. Efectos del tratamiento con progesterona sobre el comportamiento al destete en ovejas en anestro.....	31
Figura 1. Metabolismo de la Progesterona.....	14
Figura 2. Curva de lactancia durante el segundo mes de lactación para los 4 biotipos maternos.....	16
Figura 3. Niveles plasmáticos de P4 en ovejas ovariectomizadas antes, durante y después del tratamiento con CIDR por 12 o 14 días.....	17
Figura 4. Producción de leche Grupo de ovejas tratado con P4 y grupo sin tratamiento.....	24
Figura 5. Composición de la leche que se observó cada oveja tratadas con P4 y de ovejas sin tratar.....	25
Figura 6. Concentración de P4 sérica en 7 ovejas tratadas con CIDR durante 32 días.....	26
Figura 7. Peso corporal de los corderos de ovejas tratadas con P4.....	27
Figura 8. Frecuencia de registros que se observó cada oveja costeando (A) y vocalizando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con P4 y de ovejas no tratadas.....	28
Figura 9. Frecuencia de registro en que se observó cada oveja echada (A), caminando (B) y parada (C) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días y de ovejas no tratadas.....	29
Figura 10. Frecuencia de registro que se observó cada oveja pastando (A) y rumiando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con P4 y de ovejas no tratadas.....	30
Figura 11. Concentración de proteínas séricas totales antes y después del destete de ovejas tratadas con P4 y de ovejas no tratadas.....	31
Figura 12. Concentración de albuminas (A) y globulinas séricas (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con P4 y de ovejas no tratadas.....	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3α y 3β HSD: 3α y 3β - hidroxisteroide dihidrogenasas

ACTH: adrenocorticotropa

CIDR: controlled internal drug releasing

CL: cuerpo lúteo

CRH: corticotropinas

DHP: 5β dihiroprogesterona

g/d: gramos por día

GABA_A: ácido gamma-aminobutírico

GC-1: ovejas no tratadas (experimento I)

GC-2: ovejas no tratadas (experimento II)

GP4-1: ovejas tratadas con P4 durante 32 días (experimento I)

GP4-2: ovejas tratadas con P4 durante 16 días (experimento II)

HPA: eje hipotálamo-pituitario-adrenal

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Kg/d: Kilogramos por día

Ox: oxitocina

P4: progesterona

PT: proteínas totales

SNAS: sistema nervioso autónomo simpático

SNC: sistema nervioso central

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecerle y dedicarle esta tesis a Aline, nuestra tutora, ya que su invaluable dedicación, motivación y apoyo fueron muy importantes durante la realización de este trabajo.

A nuestro cotutor Rodolfo Ungerfeld por sus aportes y experiencia.

También quisiéramos agradecerle a la Facultad de Veterinaria y todos los profesores por nuestra formación como profesionales, a las funcionarias Leticia de bedelía y Rosina y Alejandra de biblioteca por brindarnos su tiempo.

A Georget Banhero, a Santuza y todo el personal de INIA La Estanzuela por ayudarnos en la parte experimental de la tesis.

A nuestros amigos por el apoyo de siempre y a nuestros compañeros de carrera por todos los momentos de estudio compartidos.

Por último, queremos dedicarles este trabajo y agradecerles a nuestras familias, por darnos la oportunidad de estudiar y formarnos como personas. Por apoyarnos en los momentos difíciles de la carrera y disfrutar con nosotros los buenos momentos.

RESUMEN

El destete temprano es una medida de manejo muy utilizada en los sistemas productivos ovinos, que provoca un gran estrés tanto en las ovejas como en los corderos. Se ha demostrado en roedores que ciertos metabolitos de la progesterona (P4) reducen la respuesta a estrés o ansiedad. Un primer objetivo de esta tesis fue demostrar si el tratamiento con niveles luteales de progesterona en ovejas en anestro reduce la respuesta fisiológica y comportamental de estrés al destete temprano. Para eliminar los posibles efectos de variaciones en el proceso de destete natural y desarrollo de los corderos a partir de diferencias en la producción de leche dadas por el tratamiento con P4, nos planteamos como segundo objetivo determinar si el tratamiento con P4 afecta la producción y composición de la leche y el peso de los corderos. El trabajo se realizó en INIA-Estación Experimental "La Estanzuela" (Colonia, Uruguay), durante la estación no reproductiva. Se utilizaron 26 ovejas Ideal (Pollwarth) multíparas de parto simple. Del total, se utilizaron 11 ovejas para el experimento I y 15 para el experimento II, que se bloquearon en 4 grupos según su fecha de parto. Para el experimento I se trataron 6 ovejas con CIDR durante 16 días (GP4-1) y las otras 5 ovejas quedaron sin tratamiento (GC-1). Se ordeñaron los 2 grupos manualmente con la técnica de ordeño de oxitocina intramuscular para estimación de la producción de leche y evaluación de la composición de la misma. Para el experimento II, se insertaron CIDR con 0,3 g de P4 (Laboratorio Pfizer, Auckland, Nueva Zelanda) a 8 ovejas durante 32 días, comenzando el día 30 posparto (GP4-2). Las otras 7 quedaron sin tratamiento (control, GC-2). Se registró el peso de los corderos durante el tratamiento con P4, las variables comportamentales (costeando, vocalizando, pastando, rumiando, echada, parada, caminando) y fisiológicas (proteínas totales, albúmina y globulinas) de las ovejas al destete. Todos los comportamientos registrados cambiaron con el tiempo ($P < 0,01$). Al día del destete las ovejas del grupo GP4-2 costearon y vocalizaron menos que las ovejas GC-2 ($P < 0,001$ y $P < 0,05$ respectivamente). En cuanto a los parámetros fisiológicos medidos, luego del destete la concentración de proteínas totales disminuyeron en las ovejas GC-2 y no cambiaron en las ovejas GP4-2. Las ovejas GP4-2 presentaron mayores valores de globulinas séricas ($P = 0,002$) que el grupo GC-2 luego del destete. La producción y composición de la leche cambiaron a lo largo del tiempo ($P = 0,0001$), no habiendo diferencias entre los grupos. En conclusión, el tratamiento con niveles luteales de P4 redujo la respuesta fisiológica y comportamental de estrés al destete temprano en ovejas en anestro, y esta diferencia no fue mediada por diferencias en la producción y composición de leche.

ABSTRACT

Early weaning is a frequent management measure in sheep production systems that causes strong stress response in both ewes and lambs. It has been shown in rodents that some progesterone's (P4) metabolites reduce the stress response and anxiety. The first aim of this thesis was to demonstrate if administration of luteal levels of P4 in anoestrus sheep reduces the physiological and behavioural stress response to early weaning. To discard possible variation effects in the natural weaning process and lambs development from milk production differences caused by P4 treatment. Thus, our second aim was to determine if the P4 treatment affects milk production and composition and lambs body weight. The study was performed in INIA "La Estanzuela" (Colonia, Uruguay), during the non-reproductive season. Twenty six Polwarth (Ideal) multiparous single-lambing ewes were used. From the total, 11 were used to experiment I and 15 to experiment II. Ewes were allocated to 4 groups homogeneous in lambing day. In experiment I, 6 ewes were treated with CIDR for 16 days (GP4-1) and the other 5 ewes remained as untreated control group (GC-1). Both groups were manually milked using the intramuscular oxytocin technique to estimate the milk production and evaluate its composition. In experiment II, 8 ewes were treated with 0.3g P4 CIDRs (Pfizer, Auckland, New Zealand Lab) during 32 days, starting 30 day postpartum (GP4-2), the others 7 ewes remained as untreated control group (GC-2). Lambs body weight was recorded during the P4 treatment. The behavioural (pacing, vocalizing, grazing, ruminating, lying, standing and walking) and the physiological variables (serum total proteins, albumin and globulin concentrations) of the ewes were recorded to weaning. All the behaviours recorded change with time ($P < 0.01$). At weaning day, GP4-2 ewes paced and vocalized less than GC-2 ewes ($P < 0.001$ y $P < 0.05$, respectively). After weaning the serum total protein concentration decrease in GC-2 and did not change in GP4-2. GP4-2 ewes had greater serum globulin concentration than GC-2 ewes ($P = 0.002$) after weaning. Milk production and composition changed with time ($P = 0.0001$) with no differences between the groups. In conclusion, treatment with luteal levels of P4 reduces physiological and behavioural stress response to abrupt weaning in anoestrus ewes and these differences were not mediated by changes in milk production and composition.

Introducción

En los sistemas de producción ovina se realizan diversas prácticas de manejo que generan estrés (Burdick et al., 2010). Entre ellas está el destete artificial, que consiste en la separación completa y repentina de las ovejas y sus crías, las que presentan cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés (ver revisión: Orgeur et al., 1998). El destete artificial es un manejo necesario en la producción ovina de lana y de carne para que la oveja recupere su condición corporal para la siguiente encarnerada; y en la producción ovina de leche ya que las ovejas separadas de sus corderos tienen mejores rendimientos de leche que los animales no separados (Napolitano et al., 2008). Sin embargo, este manejo estresante puede repercutir en el bienestar, rendimiento productivo y salud animal. Las ovejas y corderos pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades, ya que situaciones de estrés interfieren con la reacción inmunitaria (Hixon, 1981). Se ha demostrado que los corderos luego del destete reducen la ganancia de peso y son más susceptibles a parásitos (Orgeur et al. 1999). Por eso, es importante desarrollar métodos que reduzcan la respuesta de estrés al destete, mejorando el bienestar de los animales. Se ha reportado en roedores que metabolitos de la progesterona P4 con grupo 3 α -hydroxy reducen la respuesta de estrés o ansiedad (ratones: Wieland, et al., 1991; ratas: Britan, et al., 1991), por lo que el tratamiento con P4 podría ser utilizado durante manejos estresantes, como el destete, para mitigar la respuesta de estrés, contribuyendo para la mejora del bienestar animal, reducción de enfermedades y mejores resultados productivos.

Complementariamente, dado los posibles efectos de la P4 sobre la producción y composición de la leche (Labussière et al., 1993) y por consiguiente sobre el proceso de destete natural y la intensidad del vínculo madre-cría, es que también evaluamos si la P4 afecta la producción y composición de la leche para descartar posibles diferencias en la respuesta de estrés al destete artificial provocadas por diferencias en estas variables. Al mismo tiempo, hasta el momento no existen trabajos que hayan determinado los efectos del tratamiento con P4 en niveles luteales sobre la composición y producción de leche en ovinos. Por lo tanto, estudiar si la P4 afecta la producción y composición de la leche también es de interés principalmente para la producción de ovinos de leche, ya que los productores utilizan protocolos de inducción o sincronización de celo frecuentemente durante el período de lactación.

Dado lo anterior, esta Tesis plantea estudiar los efectos del tratamiento con P4 sobre la respuesta de estrés de las ovejas al destete, y como este tratamiento podría afectar la producción y composición de leche.

Revisión bibliográfica

Destete

El destete natural abarca cambios comportamentales, nutricionales, morfológicos y fisiológicos que constituyen la transición de un estado de dependencia de la madre a uno de independencia (Galef, 1981). En los ovinos, el destete natural es gradual e implica una reducción progresiva de la ingestión de leche, un consumo creciente de alimentos sólidos por la cría y cambios en la relación madre-cría (Martin, 1984). El componente más importante para evaluar los límites del destete es la cantidad de leche transferida de la oveja al cordero (Martin, 1984). La producción de leche de la oveja es un factor determinante de la intensidad del vínculo oveja-cordero, y por lo tanto de la edad en que se produce el destete natural (Arnold, 1979). A lo largo del período de lactación la frecuencia y la duración de la succión disminuye después de las 4 o 5 semanas y progresivamente la madre impide que el cordero succione (Gordon y Siegmann, 1991). Además, la distancia entre la madre y su cría aumenta con la edad del cordero (Hinch et al., 1987), reflejando una mayor independencia nutricional y social de la cría. En síntesis, todos estos cambios culminan en el destete natural del cordero que ocurre a los 4 a 5 meses de edad (Arnold et al. 1979), aunque se sugirió que en los sistemas de producción ovina en Uruguay el destete natural es más tardío (Kremer, comunicación personal).

Sin embargo, el destete realizado por los criadores de ovinos muchas veces es asociado con una separación completa y repentina de las ovejas y sus crías. Dichas prácticas inducen cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés en las ovejas y corderos (Orgeur et al., 1998). Las ovejas separadas repentinamente de sus corderos aumentan la frecuencia de vocalizaciones, la que se mantiene alta hasta 2 días después del destete (Orgeur et al., 1999). Ambos integrantes de la díada oveja-cordero utilizan estas señales de comunicación para intentar mantener contacto (Orgeur et al., 1998). Además las ovejas pasan más tiempo paradas, moviéndose con la cabeza levantada y las orejas erectas (Cockram et al., 1993). A esto se le suma la disminución del tiempo descansando y rumiando (Cockram et al., 1993), lo que indica que las ovejas perciben la separación de su cordero como nociva. Cuando las ovejas son separadas de sus corderos también presentan cambios fisiológicos como un gran incremento del cortisol sérico (Pérez-León et al., 2006), un indicador clásico de estrés (Rhind et al., 1998). Se ha reportado que los corderos destetados a los 2 días de edad tienen bajos niveles de anticuerpos en sangre (Napolitano et al., 1995) lo que los hace más susceptibles a contraer enfermedades. Si bien no hay información en ovejas, en vacas se ha demostrado que la concentración de proteínas totales (PT) aumenta y la concentración de albumina decrece luego del destete (Ungerfeld et al., 2011).

Estrés

Estrés y estresores

El término "estrés" describe un estado de amenaza a la "homeostasis" (del griego "estado constante") (Johnson et al., 1992). Las fuerzas que perturban la homeostasis se definen como "estresores" (Pacak et al., 2001), mientras que las fuerzas para neutralizar los efectos del estrés y restablecer la homeostasis se llaman "respuesta de adaptación" (Chrousos, 1988). Existen varias clasificaciones de estresores según su naturaleza. Para Van de Kar y Blair (1999) pueden ser agrupados en tres grandes categorías: 1) factores psicológicos (miedo, ansiedad, exposición a un ambiente nuevo y desconocido), 2) factores físicos (dolor, shock, inmovilización), 3) factores que desafían la homeostasis cardiovascular (calor, hemorragias, posturas). Por otro lado, Pacak y Palkovist (2001) clasifican en 4 categorías: 1) físicos (frío, calor, radiación intensa, ruido y vibración); 2) psicológicos (afectan el proceso emocional, resultando en ansiedad, miedo o frustración); 3) sociales (agresión y dominancia, aislamiento del grupo e interacción adversa con el humano); y 4) metabólicos (ejercicio físico, hemorragia, hipoglucemia). Dependiendo de la naturaleza, duración (aguda o crónica) y fuerza del estresor, y de la constitución y estado del organismo será la respuesta adaptativa que manifieste el animal (De Wied, 1980).

Respuesta simpática y neuroendócrina de estrés

Cuando un estresor es percibido, tanto el sistema simpático como el neuroendócrino se activan. El sistema que genera la respuesta más rápidamente es el sistema nervioso autónomo simpático (SNAS), mediante la acción directa en los órganos diana y en la médula de las glándulas adrenales, estimulando la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), las que pueden generar un rápido aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, midriasis y glucogenólisis. Cannon (1914, 1932) llamó a esta respuesta teoría de la "huida o pelea". Concomitantemente, las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan un péptido llamado factor de liberación de corticotropina (CRH), el que estimula a la adenohipófisis para que secrete la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la que una vez liberada a la circulación general estimula a la corteza adrenal para que secrete glucocorticoides (cortisol y corticosterona). Esta serie de eventos se conoce como activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), formando parte de la respuesta neuroendócrina de estrés (Matteri et al., 2000).

En efecto, de acuerdo con Morme (1995), la activación del sistema nervioso autónomo y del HPA son quienes permiten las modificaciones necesarias para responder a las perturbaciones sociales como la separación de la madre y su hijo (Napolitano et al., 1998).

Indicadores de estrés

Gracias a que la respuesta al estrés provoca cambios comportamentales y fisiológicos, es posible utilizar estos parámetros para estudiar la presencia de estrés en los animales. De acuerdo con Rusher (2000), lo atractivo de los cambios comportamentales yace en el hecho de que se manifiestan rápidamente y son fáciles de observar y medir. Según Cockram (1993) las ovejas suelen mantenerse alertas ante la separación de sus corderos, observando hacia el corral donde se encuentran sus crías, disminuyen el tiempo de descanso, rumian menos tiempo e incrementan la frecuencia de vocalizaciones (Orgeur et al., 1998). Ungerfeld et al. (2011) observaron que las vacas destetadas costean durante los 2 primeros días posdestete. Las ovejas incrementan el cortisol sérico y la frecuencia cardíaca mientras que disminuyen la rumia y están más tiempo paradas jadeando luego transporte por tierra (Cockram et al., 1996). Al ser la oveja un animal gregario el aislamiento social es un gran estresor, ante el que incrementa sus niveles de cortisol sérico, frecuencia cardíaca, vocalizaciones, pasa más tiempo con la cabeza en posición de alerta y disminuye las horas de sueño y de rumia (Cockram et al., 1994). Los cambios en la concentración de proteínas séricas, como proteínas totales, albúmina y globulinas, son considerados indicadores de estrés en rumiantes. En novillos y toros luego del transporte se observa un aumento de las proteínas totales, albúmina y globulinas (Galyean et al. 1981; Early et al. 2011); y en vacas luego del destete aumenta la concentración de proteínas totales y disminuyen la de albúmina (Ungerfeld et al. 2011).

Progesterona

Metabolización de la progesterona

La progesterona se sintetiza en las células de la granulosa del cuerpo lúteo, pero también lo hace en la placenta y en las glándulas adrenales (Speroff et al., 1999). El principal precursor es el colesterol, el que puede ser obtenido de la dieta (Birzniece, 2004). La metabolización de la P4 ocurre principalmente en el hígado (Pluchino et al, 2009), pero también puede ocurrir en los riñones, en los pulmones (Piccinato, 2008) y cerebro. Al ser la P4 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, notoriamente en la corteza y en el hipocampo (Compagnone & Mellon, 2000; Birzniece, 2004). En estos órganos, al ser metabolizada, la P4 forma sus metabolitos neuroactivos, uniéndose a las enzimas 5α y β reductasa. Luego de esta reducción, se obtienen los metabolitos 5α ó 5β pregnanediona [también llamadas 5α ó 5β dihidroprogesterona (DHP)]; estos últimos sufren una segunda reducción reversible e irreversible respectivamente por la 3α y 3β -hidroxiesteroide dihidrogenasas (3α y 3β HSD), formando los isómeros pregnanolonas (Wood & Gower, 2010), siendo los neuroactivos aquellos con grupo 3α -hydroxy, la allopregnanolona y pregnanolona (Figura 1).

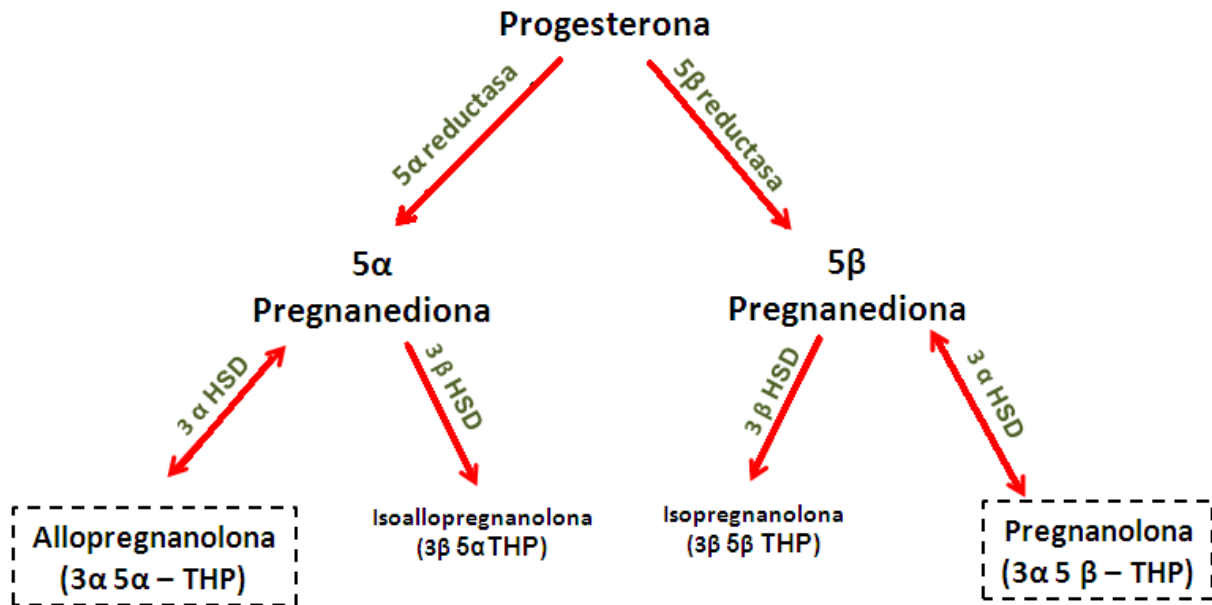


Figura 1. Metabolismo de la Progesterona (Tomado de Freitas de Melo, 2013).

Progesterona, repercusiones comportamentales y respuesta de estrés

La P4, al llegar al sistema nervioso central (SNC) ejerce una acción inhibitoria a partir de sus metabolitos neuroactivos (Bethea & Widmann., 1988; Greco et al., 2001). La P4 presenta una baja afinidad por los receptores GABA_A, receptores inhibitorios encontrados en la mayoría de las neuronas del SNC de los mamíferos (Olsen & Tobin, 1990). Por otro lado, se ha reportado que los metabolitos neuroactivos de la P4, allopregnanolona y pregnanolona, sí tienen una alta afinidad a estos receptores pudiendo reducir la excitabilidad neuronal en el SNC a partir de esta interacción, dando como resultado efectos de sedación y ansiolíticos (ratas: Britan 1991; mujeres: Carl et al, 1990, Sundstrom et al, 1999), teniendo una similar acción que los benzodiacepinicos, barbitúricos y alcohol (Majewska et al., 1986). Por lo que el tratamiento con P4 puede reducir la percepción del estresor a través de un efecto ansiolítico, generando una menor respuesta de estrés.

El eje HPA es el principal sistema de respuesta neuroendocrina al estrés (Brunton et al., 2009). Como se mencionó anteriormente, ante un estresor, el hipotálamo libera CRH, la que actúa sobre la hipófisis para que libere ACTH, que estimula a las glándulas adrenales para que secreten cortisol. Se ha comprobado que la allopregnanolona puede prevenir la secreción de las hormonas CRH (Patchev et al., 1994), ya que se demostró que la allopregnanolona redujo la transcripción de CRH y su secreción, por consiguiente redujeron la secreción de ACTH y glucocorticoides (Brunton et al., 2009). Por lo tanto, la P4 a partir de sus metabolitos neuroactivos reduce la respuesta neuroendocrina de estrés, y con eso los cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés (Brunton et al., 2009).

Progesterona y producción de leche

Dado los posibles efectos de la P4 sobre la producción y composición de la leche, y con esto posibles cambios en el proceso de destete natural y del vínculo madre-cría, es que evaluamos los efectos de la P4 sobre la producción y composición de leche. Esto permite descartar que las posibles diferencias entre los grupos en la intensidad de respuesta de estrés al destete sean generadas por esta vía.

Existe la hipótesis, al menos en las ovejas lecheras, que la presencia de un cuerpo lúteo (CL) incrementa la producción de leche (Labussière et al., 1993). Existe una relación directa entre el número de CLs y la producción de leche (Labussière et al., 1993), además de que la leche de ovejas superovuladas contiene un mayor porcentaje de grasa (Labussière et al., 1996). McKusick (2002) indicó que ovejas con presencia de CL y un CIDR tuvieron mayor eyección de leche y mayor porcentaje de grasa, pero menos de proteínas en su composición que las ovejas control. Sin embargo, todos los experimentos antes mencionados no descartan que sea el ambiente hormonal generado por el CL, y no específicamente la P4 el responsable de este aumento en la producción. Más aún, se ha postulado que el incremento de los niveles de oxitocina circulante sean los responsables del incremento en la producción (McKusick et al., 2002), ya que los niveles de oxitocina circulante son mayores en ovejas con CL que sin CL (Schams et al., 1982; Labussière et al., 1993; Marnet et al., 1998). Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento de rumiantes con oxitocina exógena aumenta la producción de leche (Heap et al., 1986; Knight, 1994). Por lo tanto, es posible suponer que el ambiente hormonal creado por el CL sea el responsable del aumento de la producción de leche y no exclusivamente la P4 (McKusick et al., 2002). Moore y Holst (1967) y Robison y Smith (1967) han demostrado que ninguna de las progestinas estudiadas, 6α , metil- 17α acetoxyprogesterone (medroxiprogesterona) y 17α -acetoxi- 9α -ftuero- 11β -hidroxy-progesterona (acetato de flurogestona) han tenido efectos en la producción de leche. Cabe resaltar que todos los trabajos anteriormente mencionados fueron realizados utilizando dosis suprafisiológicas de P4 o con progestágenos artificiales, no habiendo hasta el momento trabajos que hayan evaluado el efecto del tratamiento con niveles luteales de P4 sobre la producción y composición de leche.

Producción y composición de la leche

La curva de lactación de la oveja normalmente presenta un pico de producción a los 20 a 30 días luego del parto (Banchemo et al., 2003). Sin embargo, la máxima producción puede ocurrir desde el primer día. Esto depende de la raza de la oveja, del estado nutricional y de la demanda de los corderos (Banchemo et al., 2003). En la figura 2 se muestra la producción de leche en ovejas Ideal, la raza que se utilizó en este estudio.

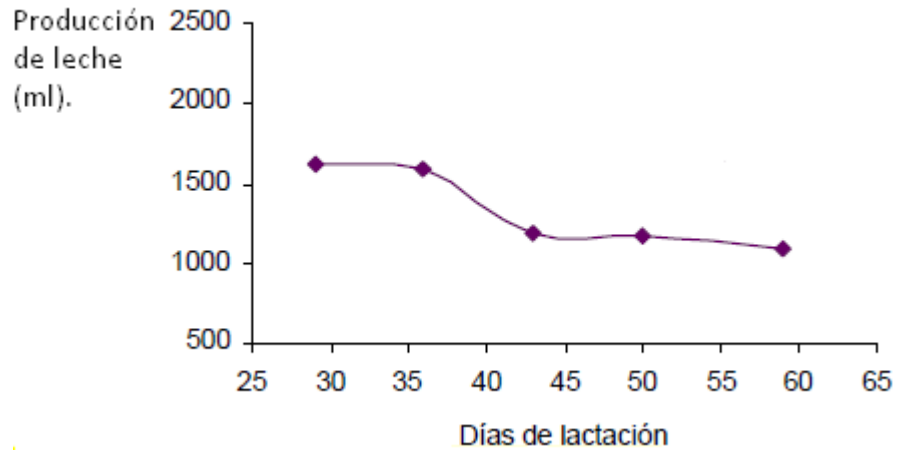


Figura 2. Curva de lactancia durante el segundo mes de lactación de la raza Ideal. (Bencheró et al., 2003).

Cuando la producción de leche comienza a disminuir se aumenta la concentración de algunos de los componentes químicos de la leche, principalmente de grasa y de lactosa, siendo la media para la especie ovina 7,2 % de grasa, 4,4 % de lactosa y 5,5% de proteína (Molina., 1987). Por lo tanto, durante el período de lactación de las ovejas ocurre un aumento seguido de una disminución en la producción de leche, acompañado de variaciones en la composición de la leche.

CIDR

El CIDR es un dispositivo intravaginal de elastómero de silicona impregnado con 0,3g de P4, utilizado principalmente para sincronizar los celos de las ovejas en tratamientos de 14 días (Wheaton et al., 1993). La concentración sérica máxima de progesterona se alcanza a las 2 h de insertado el dispositivo, se mantienen los niveles luteales durante los 14 días de tratamiento y desciende a los valores basales a las 2 h de retirado (Figura 2) (Tomado de Ainsworth & Downey, 1986; Vilariño et al., 2010).

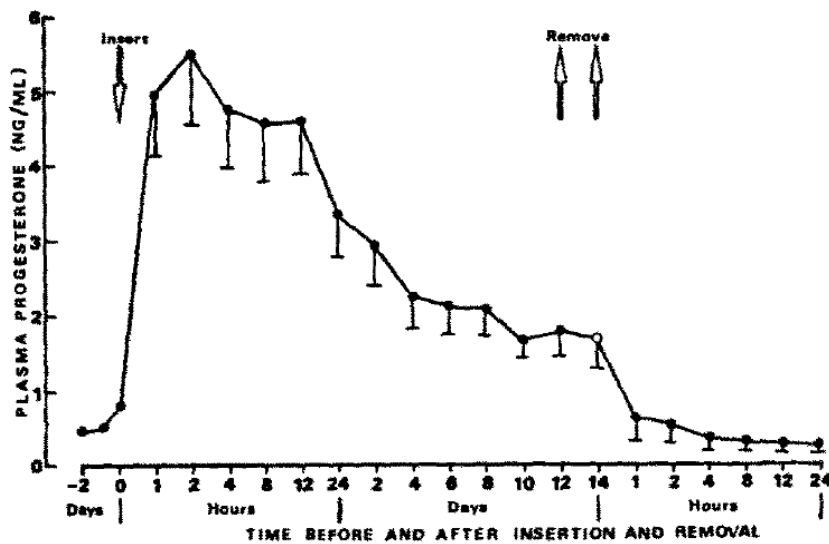


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de P4 en ovejas ovariectomizadas antes, durante y después del tratamiento con CIDR por 12 o 14 días (Tomado de Ainsworth & Downey, 1986).

Hipótesis

En base a todo lo anterior, nos planteamos como hipótesis que el tratamiento con concentraciones luteales de P4 en ovejas en anestro reduce la respuesta fisiológica y comportamental de estrés al destete temprano.

Objetivos

General

Demostrar si el tratamiento con CIDR que genera concentraciones luteales de P4 en ovejas en anestro reduce la respuesta fisiológica y comportamental de estrés al destete temprano, y si altera la producción y composición de la leche, y el peso de los corderos.

Materiales y Métodos

Local de estudio, animales y manejo

El estudio fue realizado en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), en la estación experimental “La Estanzuela”, en el Departamento de Colonia (34° 28' S / 57° 51' O), Uruguay. Se utilizaron 26 ovejas Ideal (Polwarth) múltiparas de parto simple. Al momento del parto se registró el peso y sexo de las crías. Al comienzo del experimento, el total de animales se encontraron como único lote con sus crías en pradera de trébol rojo y alfalfa con agua *ad libitum*.

Del total de ovejas, 11 ovejas se utilizaron para el Experimento I (Tratamiento de P4 y producción y composición de la leche). 15 se utilizaron para el Experimento II (Tratamiento con P4 y respuesta al estrés del destete temprano).

Previo a los experimentos, se realizaron sangrados por venopunción de la yugular, y se determinó la concentración de P4 en sangre para verificar que las ovejas estuviesen en anestro, considerándose los niveles > a 3,2 nmol/mL como de una fase luteal.

Experimento I: Tratamiento de progesterona y producción y composición de la leche

Animales y tratamiento

Se utilizaron 11 ovejas que se dividieron en 2 grupos experimentales de acuerdo a la fecha de parto y la producción inicial de leche. A 6 ovejas se les colocó CIDRs a partir de los 35 días posparto durante 16 días, cambiándolos el día 9 de colocados (Día 44 posparto) (GP4-1), quedando otras 5 ovejas sin tratamiento (grupo GC-2).

Producción de leche

Se ordeñaron las ovejas manualmente en 5 días distintos, 2 veces antes de comenzar el tratamiento con CIDRs (días 23 y 34 posparto), y 3 veces luego de colocar los CIDRs (días 43, 46 y 50 postparto). Se realizó la técnica de ordeño con oxitocina, que consiste en aplicar 5 UI de oxitocina intramuscular (Hipofamina, Laboratorios Dispert, Montevideo, Uruguay) y ordeñar completamente las glándulas mamarias (Sphor et al. 2011). Previo al primer ordeño, se separaron las ovejas de sus corderos y se las colocó en un corral con fardos de alfalfa y agua *ad libitum*. A las 4 horas se repitió el ordeño con la misma técnica, y se pesó la leche obtenida. Se estimó la producción de leche de las 24 h a partir de la leche producida en 4 h (Doney et al., 1979). Luego del segundo ordeño se juntaron las ovejas con sus corderos.

Composición química de la leche

Se obtuvo una muestra de aproximadamente 40 mL de leche del segundo ordeño de cada oveja, se colocó en un recipiente con Lactopol, y se congeló a -20°C. La composición de la leche fue determinada en el Laboratorio de Calidad de Leche de

la Estación Experimental “La Estanzuela” de INIA utilizando un equipo Lactoscan Milkanalyzer (Nova Zagora, Bulgaria).

Experimento II: Tratamiento con progesterona y respuesta al estrés del destete temprano

Animales, manejo y tratamiento

Se utilizaron 15 ovejas, las que fueron adjudicadas a 2 grupos experimentales similares de acuerdo al día de parto, peso y condición corporal. Siete ovejas se trataron con CIDR con 0,3 g de progesterona (Laboratorio Pfizer, Auckland, Nueva Zelanda) durante 32 días (GP4-2) y 8 ovejas quedaron sin tratamiento (GC-2). El tratamiento del GP4-2 comenzó a los 30 días posparto. Para asegurar concentraciones luteales de P4 sérica durante los 32 días de tratamiento, se cambiaron los dispositivos cada 8-11 días. Cinco días antes del destete, los animales fueron transferidos a 2 corrales (uno para cada grupo experimental). Dichos corrales eran de 40 m x 30 m limitados por una red eléctrica, separados entre sí 15 m para evitar interacciones entre ambos grupos. Los animales permanecieron en una pradera de alfalfa y trébol rojo y agua ad libitum.

El destete se realizó el día 59 posparto (Día 0) a las 6:30 am. Las madres volvieron a los mismos corrales en la pradera, mientras que las corderas se mantuvieron a 1000 m de distancia de ellas para así lograr la total separación madre-cría y evitar interacciones auditivas, visuales y olfativas.

Observaciones de comportamiento

Las observaciones y registros de comportamiento de los animales comenzaron 3 días predestete (Días -3, -2 y -1) y siguieron hasta 4 días posdestete. Se realizan registros scan, cada 10 minutos, durante 3 horas en la mañana (7:30 a 10:30 h) y 3 horas en la tarde (16:30 a 19:30 h). Se asignó un observador para cada grupo experimental, los que se mantuvieron a 10 m de distancia de los corrales, pudiendo ver claramente a los animales sin interferir con su comportamiento. Se registró cada vez que los animales estaban caminando, parados, echados, pastando, rumiando y costeando (Cuadro 1). El parámetro “vocalizando” fue observado cada 10 minutos, durante un período de 30 segundos, se utilizó muestreo 0/1 (no vocalizó/vocalizó). Antes del destete, complementariamente al scan se realizó observación focal del grupo para registrar las veces que los corderos se amamantaban.

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 o 2 m paralelamente al alambrado
Vocalizando	Balando con la boca abierta o cerrada

Muestras de sangre

Se obtuvieron muestras sanguíneas por venopunción de la yugular en los días -35, -29, -23, -19, -13, -8, -4, 0 y 3. Las muestras fueron colectadas en tubos sin anticoagulante y centrifugadas por 10 min a 1500 g. El suero obtenido se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

Cambios fisiológicos

Se determinó la concentración de albumina y de PT de los sueros colectados en los días -4, 0 y 3 por la técnica de Biuret y por un kit comercial (Bio-Systems, Barcelona, España), respectivamente, en el Área de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. La concentración de globulinas se estimó por la diferencia entre albumina y PT (Säkkinen et al. 2005).

Niveles de progesterona

Para corroborar los niveles séricos de P4 de las ovejas GP4-2, primero se tomó una muestra el día -35, luego se tomaron muestras los días -29 (inmediatamente antes de colocado el CIDR), -23, -19, -13, -8, -4, 0 y 3 con el fin de monitorear todo el período de tratamiento. A las ovejas del GC-1 se les midió la P4 los días -35, -29, -8 y 0 con lo que se descartó que hubiera ovejas ciclando. Se midió la P4 sérica en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, count-A-Count, Siemens, California, EUA).

Peso de los corderos

Los corderos se pesaron al -59, -29, -13, -4 y 0.

Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de observaciones en el que cada oveja realizó cada comportamiento, el que es presentado como media \pm SEM. Se comparó la frecuencia de amamantamiento por ANOVA. Las frecuencias de los otros comportamientos, el peso de los corderos, la PT, albúmina y globulinas (Estudio I), y la producción y composición de leche (Estudio II) fueron comparadas entre los tratamientos con ANOVA para mediciones repetidas, utilizando el modelo mixto de SAS (2003; SAS Institute, Carolina del Norte, EUA). Para las variables del Estudio II, se incluyó el valor medio de los datos de todos los días anteriores al tratamiento con P4 en el modelo como covariable. El modelo incluyó los tratamientos (GP4-1 vs. GC-1 y GP4-2 vs. GC-2), el tiempo, y la interacción entre los tratamientos y el tiempo como efectos fijos, y la oveja de cada grupo como un efecto al azar.

Resultados

Experimento I: Tratamiento de progesterona y producción y composición de la leche.

Producción de leche

No hubo diferencias entre los grupos en la producción de leche, pero esta disminuyó con el tiempo ($P < 0,0001$) (Figura 4).

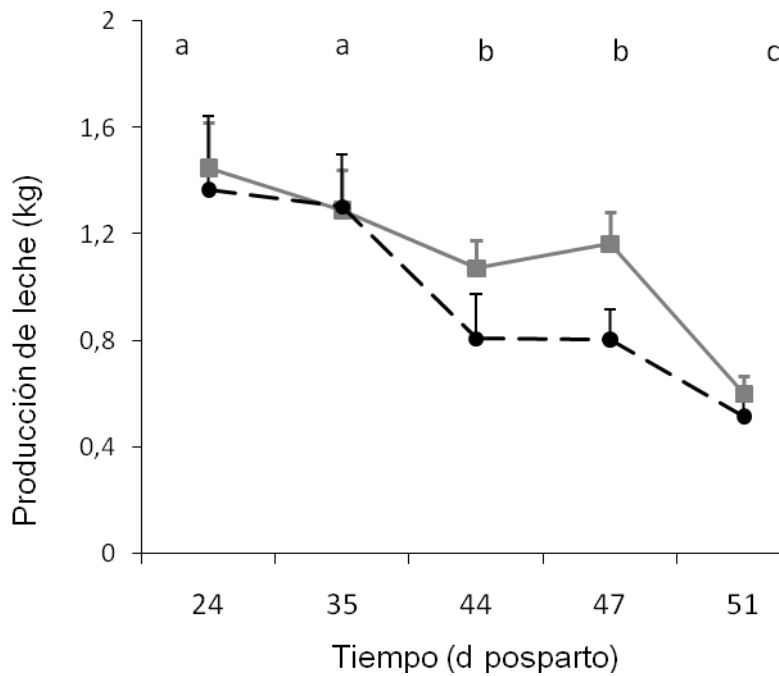


Figura 4. Producción de leche (Media \pm SEM). Grupo tratado con progesterona durante 16 días (-■-) y grupo sin tratamiento (-●-). Diferentes letras indican las diferencias entre los días ($P < 0,005$).

Composición de la leche

No hubo diferencias entre los grupos GP4-1 y GC-1 en los contenidos de proteína, grasa y lactosa de la leche, pero todos estos componentes de la leche analizados cambiaron a lo largo del tiempo ($P < 0,004$) (Figura 5 A, B y C).

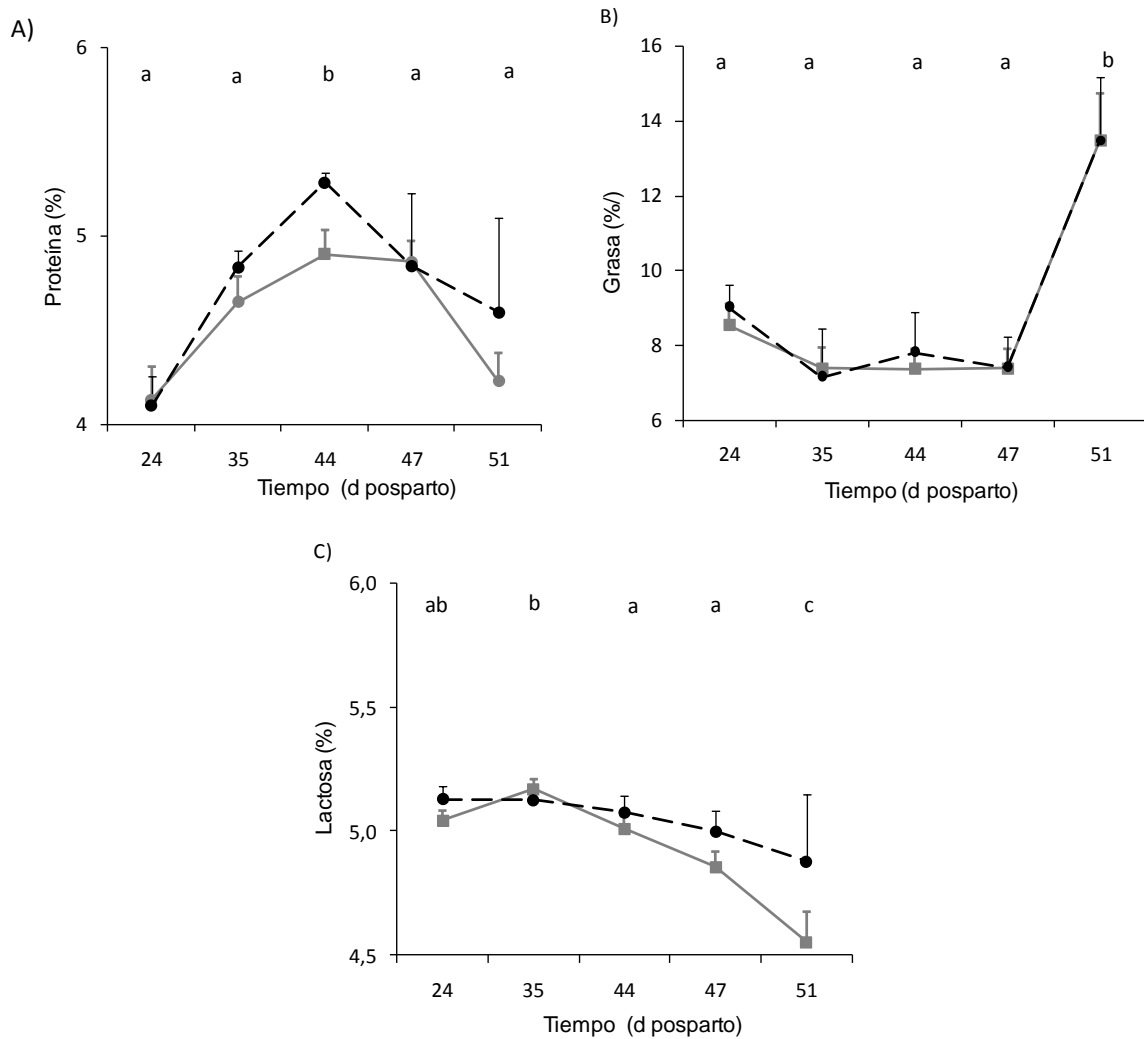


Figura 5. La composición de la leche (Media \pm SEM) que se observó cada oveja tratada con progesterona durante 16 días (-■-) y de ovejas sin tratar (-●-). Las diferentes letras explican diferencias entre los días ($P < 0,005$).

Experimento II: Tratamiento con progesterona y respuesta al estrés del destete temprano

Determinación de las concentraciones de progesterona sérica durante el tratamiento con CIDR

Las concentraciones de P4 sérica en el GP4-2 durante el tratamiento fueron similares a los valores de una fase luteal normal (Figura 6).

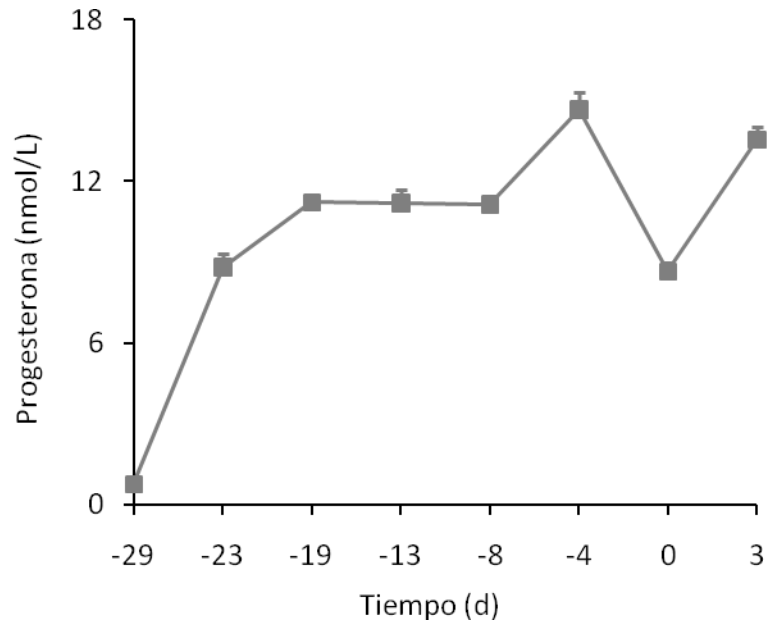


Figura 6. Concentración de P4 sérica (Media \pm SEM) en 7 ovejas tratadas con CIDR durante 32 días. Los CIDRs se insertaron el día -29, y fueron cambiados los días -19, -8 y 0 (Día 0 = destete).

Peso de los corderos

El peso de los corderos aumentó con el tiempo ($P = 0,001$) de manera similar en ambos grupos (Figura 7).

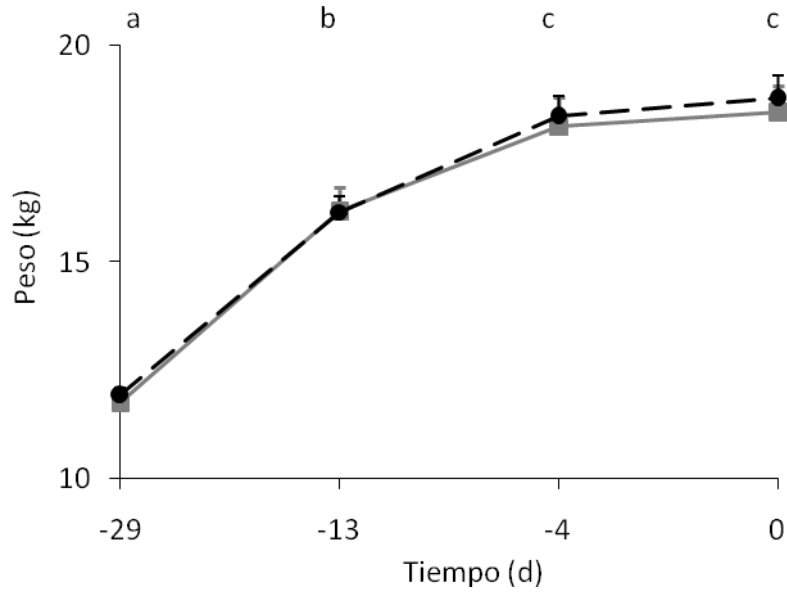


Figura 7. Peso corporal de los corderos (Media \pm SEM). Corderos de ovejas tratadas con P4 durante 32 días (-■-). El tratamiento con CIDR comenzó el día -29. Corderos de ovejas no tratadas (-●-). El tiempo es en relación al día del destete (Día 0). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los días ($P < 0,0001$).

Registros comportamentales

Todos los comportamientos registrados cambiaron con el tiempo (Cuadro 2). No hubo diferencias entre los grupos en el porcentaje de observaciones de amamantamiento ($8,8 \pm 1,2$ vs. $10,4 \pm 0,4$ % para las ovejas GP4-2 y GC-2 respectivamente ($P= 0,01$).

En cuanto a los comportamientos observados que mejor manifiestan el estrés del animal al destete, costeando y vocalizando, hubo interacción grupo y tiempo ($P=0,05$ para ambos comportamientos). Se registró un mayor porcentaje de ambos sólo en el día 0, con una marcada diferencia entre grupos, siendo mayor el porcentaje en las ovejas no tratadas que en las tratadas con P4 ($P=0,0007$ y $P<0,04$ respectivamente) (Figura 8 A y B).

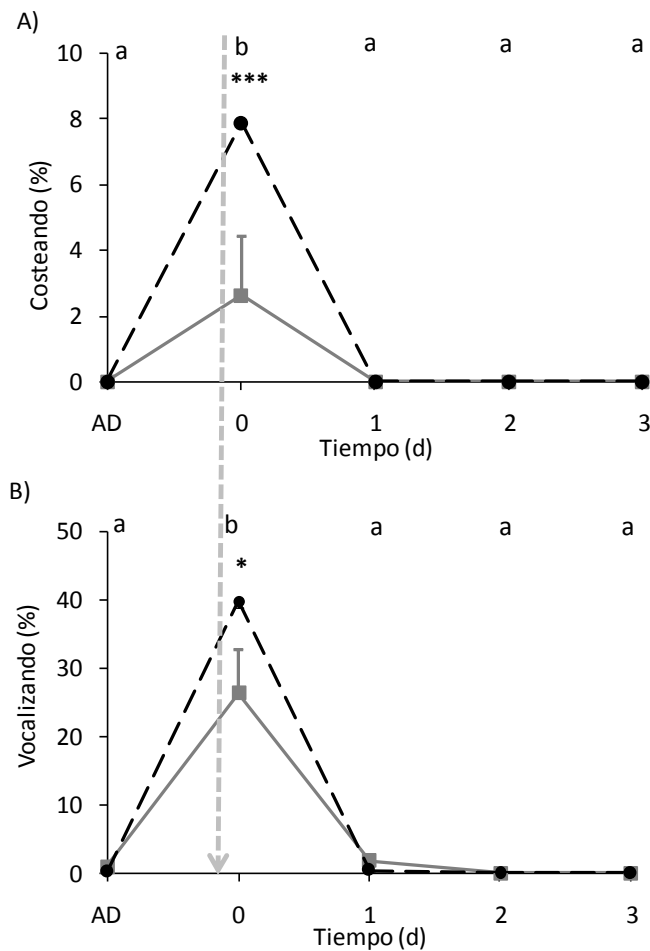


Figura 8. Frecuencia de registros (Media \pm SEM) que se observó cada oveja costeando (A) y vocalizando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona durante 32 días (-■-) y de ovejas no tratadas (-●-). AD es el período antes del destete, representado por el valor de la media de los 3 días previos al destete (Día -3 al Día -1), representando con la flecha puntillada el Día 0, día del destete. Las diferentes letras explican diferencias entre los días ($P<0,0001$). Uno y tres asteriscos indican diferencias entre los grupos ($P<0,05$ y $P<0,001$ respectivamente).

Los efectos generales de grupo, tiempo e interacción están presentados en la Cuadro 2. El comportamiento echada (Figura 9A) disminuyó el día 0 ($P=0,0001$) volviendo a los valores iniciales el día 2. En este comportamiento también se observó una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,03$): mientras las ovejas GP4-2 no cambiaron el porcentaje de registros echadas del Día 0 al Día 1, este porcentaje si aumentó en las ovejas GC-2 en el mismo período. Las ovejas GP4-2 tendieron a caminar más que las ovejas GC-2 ($P=0,09$) (Figura 9B). El porcentaje de observaciones en que las ovejas estuvieron caminando (Figura 9B) y paradas (Figura 9C) aumentaron el día 0 ($P=0,1$) volviendo a los valores iniciales al día 3.

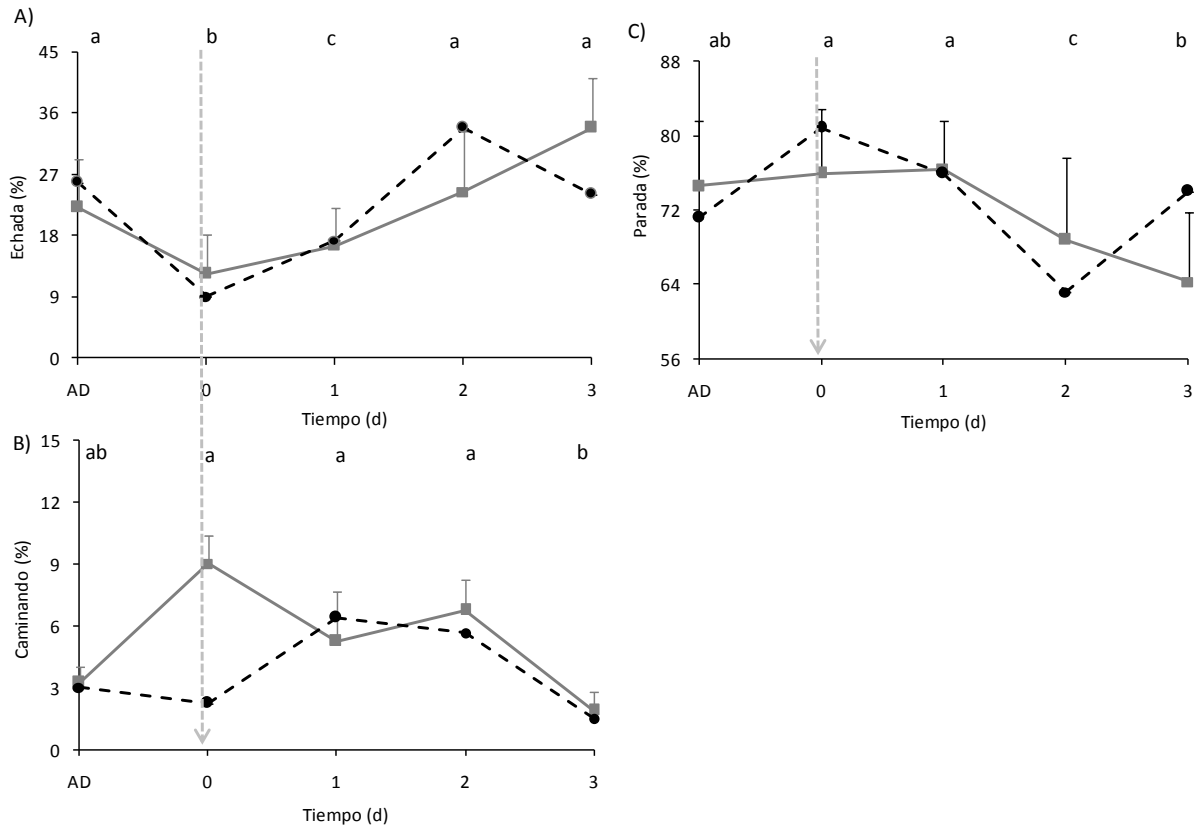


Figura 9. Frecuencia de registro (Media \pm SEM) en que se observó cada oveja echada (A), caminando (B), parada (C) antes y después del destete de ovejas tratadas con CIDR durante 32 días (-■-) y de ovejas no tratadas (-●-). AD: período antes del destete, representado por el valor de la media de los 3 días previos al destete (Día -3 al Día -1). La flecha puntillada indica el momento en que se realizó el destete. Día 0: día del destete. Las diferentes letras explican diferencias entre los días ($P < 0,02$).

Para los comportamientos rumiando y pastando no hubo efecto de grupo ni interacción. Se registró una disminución del porcentaje de las observaciones en los comportamientos pastando y rumiando el día 0 ($P=0,04$), que los volvieron a los valores iniciales el día 1 (Figura 10 A y B).

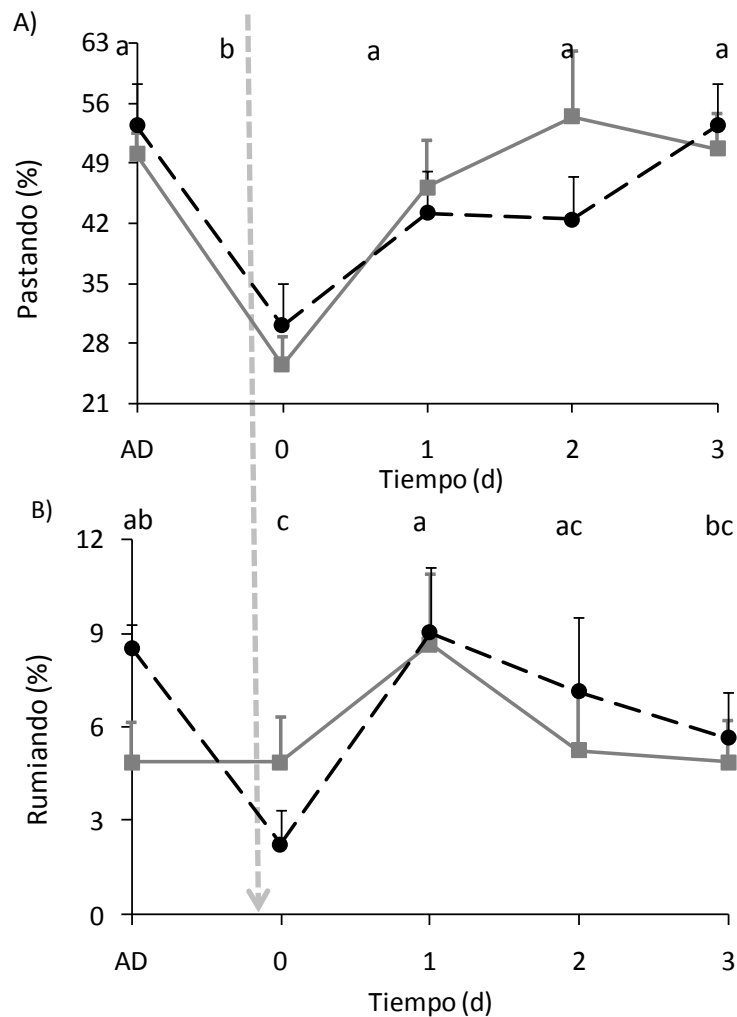


Figura 10. Frecuencia de registros (Media \pm SEM) que se observó cada oveja pastando (A) y rumiando (B) antes y después del destete de ovejas tratadas con progesterona por 32 días (-■-) y de ovejas no tratadas (-●-). AD es el período antes del destete, representado por el valor de la media de los 3 días previos al destete (Día -3 al Día -1), La flecha puntillada indica el momento en que se realizó el destete, el Día 0. Las diferentes letras explican diferencias entre los días ($P < 0,01$).

Cuadro 2. Efectos del tratamiento con progesterona sobre el comportamiento al destete en ovejas en anestro.

Comportamiento	Grupo	Tiempo	Interacción Gr*ti
Parada	ns	<0,02	ns
Echada	ns	<0,0001	0,03
Caminando	0,09	0,02	ns
Pastando	ns	<0,0001	ns
Rumiando	ns	0,01	ns
Costeando	<0,05	<0,0001	0,05
Vocalizando	<0,001	<0,0001	0,05

ns: no hubo diferencias significativas.

Proteínas séricas

A lo largo del tiempo estudiado no hubo diferencias significativas en los niveles de PT en las ovejas ($P=0,04$). Hubo interacción grupo y tiempo para concentración de PT ($P=0,05$): al día 3 fueron mayores en las ovejas tratadas que en las ovejas control ($P=0,005$) (Figura 11).

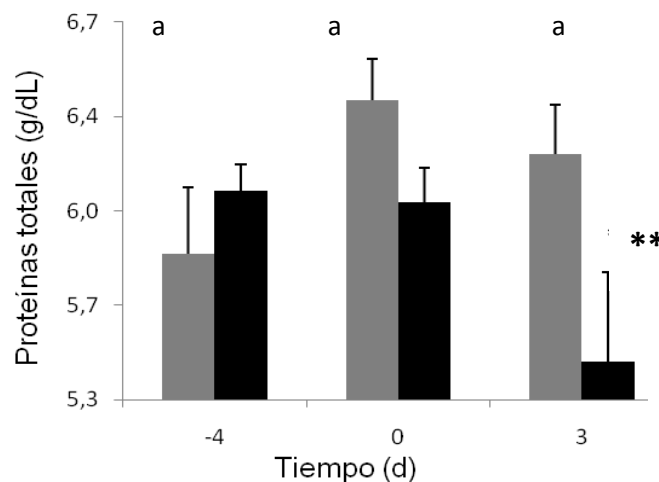


Figura 11. Concentración de proteínas séricas totales antes y después del destete de ovejas tratadas con P4 (barra gris) y de ovejas no tratadas (barra negra). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ($P<0,0004$). Dos asteriscos indican diferencias entre los grupos ($P<0,01$).

La concentración de albúmina y globulinas séricas cambió con el tiempo ($P=0,0002$ y $P=0,001$, respectivamente). Hubo una tendencia para un efecto de grupo y a interacción en los valores obtenidos de albúmina sérica, tendiendo a ser mayor en el GC-2 que en el grupo tratado ($P=0,08$; Figura 12A). En cuanto a las globulinas séricas, el grupo tratado presentó valores mayores que el grupo control ($P=0,002$). Además, hubo interacción entre grupo y tiempo ($P=0,01$): el día 3 las ovejas GP4-2 presentaron mayor concentración de globulinas que las GC-2 ($P=0,0008$) (Figura 12B).

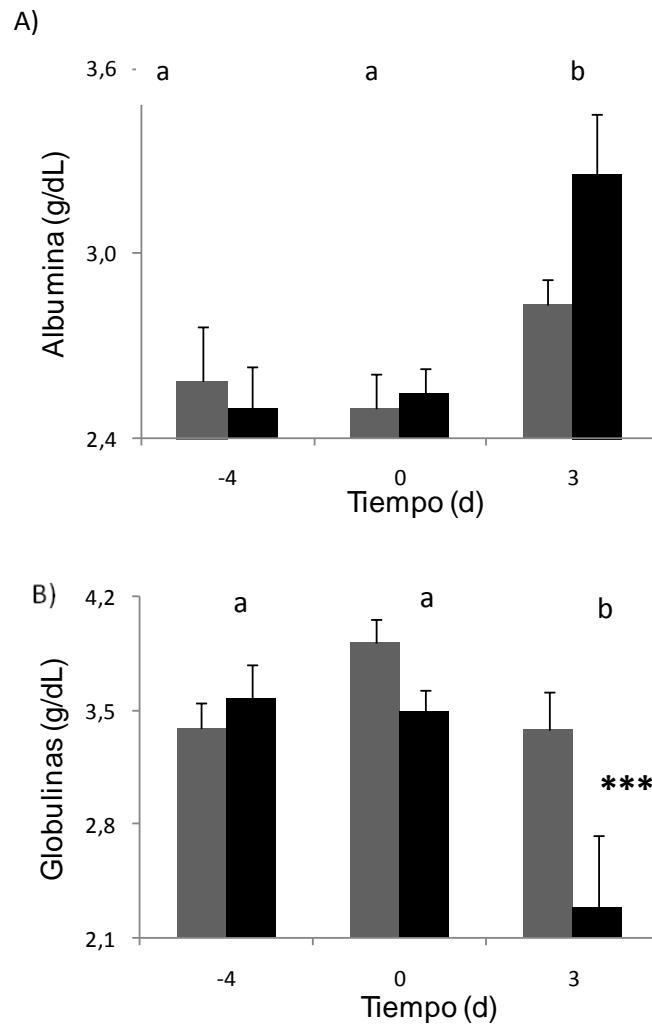


Figura 10. Concentración de albuminas (A) y globulinas séricas (B) antes y después del destete (media \pm SEM) de ovejas tratadas con P4 durante 32 días (barras grises) y de ovejas no tratadas (barras negras). El tiempo es en relación al destete (Día 0). Diferentes letras indican diferencias entre los días ($P<0,0004$). Tres asteriscos indican diferencias entre los grupos ($P<0,001$).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la hipótesis planteada, ya que el tratamiento con concentraciones luteales de P4 disminuyó los cambios comportamentales y fisiológicos indicadores de estrés al destete artificial de las ovejas. Todas las variables comportamentales observadas en este trabajo cambiaron con el destete, siendo que los comportamientos más indicativos de la respuesta de estrés al destete (costeando y vocalizando) se observaron con menor frecuencia en las ovejas tratadas con P4. A su vez, los indicadores fisiológicos de estrés, PT y las globulinas séricas, presentaron menores cambios al destete en las ovejas tratadas con P4 que en las ovejas no tratadas. Además, al no haber encontrado efectos del tratamiento con P4 en la producción y composición de la leche, y no verse afectado el peso de los corderos, podemos especular que el tratamiento no interfirió a través de diferencias en la producción de leche en la intensidad del vínculo madre-cría. Por lo tanto, se percibió el destete artificial con la misma intensidad en ambos grupos, ya que la producción de leche de las ovejas es un factor determinante en el proceso de destete natural y por lo tanto en la intensidad del vínculo oveja-cordero (Arnold, 1979). No existen trabajos previos de investigación en ruminantes relacionados con el tratamiento con P4 y la respuesta de estrés, pero estos resultados concuerdan con el estudio realizado en ratas por Britan et al. (1991) que confirmó que el tratamiento con P4 redujo la respuesta de estrés. Especulamos que la menor respuesta de estrés o ansiedad sea debida a la acción de los metabolitos allopregnanolona y pregnanolona, ambos moléculas neuroactivas derivadas de la P4 que contienen el grupo 3 α -hydroxy (Lambert et al., 2009).

Los cambios comportamentales costeando y vocalizando, fueron los más notorios al momento del destete artificial, siendo de brusca aparición, alta frecuencia y rápido retorno a los valores iniciales. Además, estas respuestas fueron mitigadas por el tratamiento con P4. Las ovejas del grupo control vocalizaron en el 40% de las observaciones, mientras que el grupo tratado sólo lo hizo un 20%. La corta duración en el aumento de estos comportamientos se puede explicar debido a que son utilizados por las ovejas para reunirse con sus crías, pero al no recibir una respuesta a cambio, los animales desisten de esta búsqueda. Además, la disminución brusca de las vocalizaciones puede ser explicada por la fatiga vocal generada en el animal debida a un alta frecuencia de vocalizaciones (Pitcher et al., 2012). Por otro lado se sabe que es una actividad de gran demanda física ya que mientras están vocalizando y costeando, no pastan, ni rumian ni se echan, lo que también podría explicar la corta duración de estos comportamientos. En síntesis, las ovejas tratadas cambiaron su comportamiento al destete con actitudes menos costosas.

Los componentes fisiológicos estudiados, también fueron mitigados por el tratamiento con P4. Esto se ve reflejado en los niveles de PT séricas, los cuales no cambiaron posdestete en las ovejas PG4-2 y disminuyeron notoriamente en el grupo control. Esta reducción en los valores de PT puede ser explicada por la reducción en los valores de globulinas sérica en las ovejas GC-2, que llegaron hasta niveles de hipoglobulinemia (valores normales: 3,1-5,1g/dl; Hearly & Falk; 1974). En este sentido, Napolitano et al. (1995) observaron en los corderos una respuesta inmune humoral menor como consecuencia de la separación temprana (2 días posparto), lo que se podría adjudicar a una variación en los niveles de globulinas séricas. Las

globulinas forman los anticuerpos usados en las defensas contra las enfermedades (Boffi, 2007); por lo tanto, es posible especular que el tratamiento con P4 al destete dejaría el animal menos susceptible a padecer de alguna patología posdestete, ya que las concentraciones de globulinas estaban dentro de los rangos normales. Las ovejas no tratadas presentaron niveles de hipoglobulinemia, lo que podría reflejar un estado de inmuno-deficiencia (Allison, 2012), y una mayor susceptibilidad a enfermedades posdestete.

No hubo diferencias entre grupos en la producción ni composición de la leche. La producción fue de 1,04 kg/d, encontrándose dentro de los parámetros normales de la raza Ideal (1,23 kg/d) (Sphor et al., 2011). En cuanto a la composición de la leche, la concentración de grasa fue 8,9% promedio, siendo mayor a la normal para la raza (7,8% Grasa) (Sphor et al., 2011) y lo reportado en otras razas (7,16% en Corriedale, Kremer et al., 1996; 8,48% en Merino Australiano, Pulina y Nudda, 2004). Una posible explicación es la técnica de ordeño utilizada, ya que al administrar oxitocina, ésta logra un vaciamiento total de la glándula mamaria, incluyendo la leche residual. Dado que la fracción final del ordeño es la que tiene mayor cantidad de grasa (Dpto. Ovinos, Lanos y Caprinos, 2009), es esperable esta diferencia. A su vez, al final del experimento se observó un pico en la concentración de grasa (13,4%), el que fue homogéneo para ambos grupos. El mismo no puede ser atribuido a un problema de medición en el laboratorio ya que todas las muestras fueron medidas en forma ciega simultáneamente, pero el aumento se registró en todas las ovejas solamente en ese punto. Tampoco hubo manejos de campo diferentes, por lo que no es posible saber cuál fue el origen de esta cantidad de grasa. Los niveles de los demás componentes en el experimento fueron 4,7% de proteína y 5% de lactosa siendo los parámetros normales para la raza 4,4% y 5,3% respectivamente (Sphor et al., 2011). Se observó una disminución temprana en la producción de leche, la que fue homogénea para ambos grupos, por lo que se puede especular que se deba al manejo de las ovejas durante el experimento. Por último, el peso de los corderos aumentó 210 g/d en ambos grupos, estando este en el entorno del promedio nacional de la raza Ideal (250g/d) (Bancho et al., 2003). El tratamiento con P4 no afectó la producción y composición de la leche, ni el peso de los corderos, demostrando que esta no fue una vía por la cual la P4 redujo la respuesta de estrés al destete.

Conclusión

El tratamiento con niveles luteales de P4 en ovejas en anestro disminuyó las respuestas comportamentales y fisiológicas de estrés generado por el destete artificial, efecto que no fue mediado por diferencias en la producción y composición de la leche.

Bibliografía

1. Ainsworth L, Downey BR, (1986). A controlled internal drug-release dispenser containing progesterone for control of the estrous cycle of ewes. *Theriogenology* 26:847-856.
2. Allison RW, (2012). Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. En: Thrall MA. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Oxford, Blackwell, p.460-475.
3. Arnold GW, Wallace SR, Maller RA, (1979). Some factors involved in natural weaning processes in sheep. *Applied Animal Ethology* 5:43–50.
4. Banchemo G, Delucci MI, (2003). Producción y calidad de la leche de los biotipos maternos de INIA La Estanzuela. *Revista INIA, Serie Jornada de Difusión N°342*, p.32-35.
5. Behl C, (2002). Estrogen can protect neurons: modes of action. *Biochemistry Molecular Biology* 83:195-197.
6. Bethea CL, Widmann AA, (1998). Differential expression of progesterin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology* 139:677-687.
7. Birzniece V, (2004). Neuroactive steroids and rat CNS. From the Department of Clinical sciences, Obstetrics and Gynecology and the Department of Public Health and Clinical Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden. 91 p.
8. Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK, (1991). Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [1Z]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor. *Brain Research* 561:157-161.
9. Boffi FM, (2007). Fisiología del ejercicio equino, Buenos Aires ed. Intermédica 105-116pp. Disponible en: http://jinetesderaid.es/2008/ponencias/Fisiol_Patolog.pdf. Fecha de consulta 11/02/2014.
10. Brunton PJ, McKay AJ, Ochedalski T, Piastowska A, Rebas E, Lachowicz A, Russell JA, (2009). Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. *Journal of Neuroscience* 29:6449-6460.
11. Burdick NC, Carroll JA, Hulbert LE, Dailey JW, Willard ST, Vann RC, Welsh THJr, Randel RD, (2010). Relationships between temperament and transportation with rectal temperature and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. *Livestock Science* 129:166–172.
12. Cannon WB, (1914). The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology* 33:356-372.
13. Cannon WB, (1932). *The wisdom of the body*. New York: W. W. Norton. 312 p.
14. Carl P, Hogskilde S, Nielsen JW, Sorensen MB, Lindholm M, Karlen B, Backstrom T, (1990). Pregnanolone emulsion preliminary pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new intravenous anaesthetic agent. *Anaesthesia* 45:189-197.
15. Chrousos GP, Loriaux LD, Gold PW, (1988). The concept of stress and its historical development. En: Chrousos, GP, Loriaux LD, Gold W, (eds.) *Mechanisms of physical and emotional stress. Advances in experimental medicine and biology*. New York: Plenum Press , p.115-130.

16. 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. *Applied Animal Behavior Science* 38:127-142.
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. *Animal Science* 62:461-477.
18. Cockram MS, Ranson M, Imlah P, Goddard PJ, Burrells C, Harkiss GD, (1994). The behavioural, endocrine and immune response of sheep to isolation. *Animal Production* 58:389-399.
19. Compagnone NA, Mellon SH, (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinology* 21:1-56.
20. Doney JM, Peart JN, Smith WF, Louda F, (1979). A consideration of the technique for estimation of milk yield by suckled sheep and a comparison of estimates obtained by two methods in relation to the effect of breed, level of production and stage of lactation. *Journal of Agricultural Science* 92:123-132.
21. Earley B, McDonnell B, Murray M, Prendiville DJ, Crowe MA, (2011). The effect of sea transport from Ireland to the Lebanon on inflammatory, adrenocortical, metabolic and behavioural responses of bulls. *Research in Veterinary Science* 91:454-464.
22. Freitas de Melo A, (2013). Efectos del tratamiento con progesterona o de la suspensión del mismo sobre la respuesta de estrés en ovejas. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. 57 p.
23. Galef BG, (1981). The ecology of weaning: parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. En: Gubernick DJ & Klopfer PH, New York. *Parental Care in Mammals* 211-241pp. Disponible en: <http://www.indiana.edu/~ablab/weaningpdfs/weaning1maternal.pdf>. Fecha de consulta 11/02/2014.
24. Galyean ML, Lee RW, Hubbert ME, (1981). Influence of fasting and transit on ruminal and blood metabolites in beef steers. *Journal Animal Science* 53:7-18.
25. Gordon K, Siegmann M, (1991). Suckling behaviour of ewes in early lactation. *Physiology and Behaviour* 50:1079-1081.
26. Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ, Blaustein JD, (2001). Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142:5172-5181.
27. Heap RB, Fleet IR, Proudfoot R, Walters DE, (1986). Residual milk in Friesland sheep and the galactopoietic effect associated with oxytocin treatment. *Journal of Dairy Research* 53:187-195.
28. Hearly PJ, Falk RH, (1974). Values of some biochemical constituents in the serum of clinically normal sheep. *Australian Veterinary Journal* 50:302-305.
29. Hinch GN, Lecrivain E, Lynch JJ, Elwin RL, (1987). Changes in maternal-young associations with increasing age of lambs. Amsterdam. *Animal Behaviour Science* 17:305-318.
30. Hixon DL, Kesler DK, Troxel TR, (1981). Reproductive hormone secretion and first service conception rate subsequent to ovulation control with synchromate B. *Theriogenology* 16:219. Disponible en: <http://www.grandin.com/spanish/reduccion.estres.manejo.html>. Fecha de consulta: 12/12/2013.

31. Johnson E, Kamilaris T, Chrousos G, Gold P, (1992). Mechanisms of stress. A dynamic overview of hormonal and behaviour homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews* 16(2):115-130.
32. Knight CH, (1994). Short-term oxytocin treatment increases bovine milk yield by enhancing milk removal without any direct effect on mammary metabolism. *Journal of Endocrinology* 142:471–473.
33. Kremer R, Rosés L, Rista L, Barbato F, Perdigón F, Herrera V, (1996). Machine milk yield and composition of non-dairy Corriedale sheep in Uruguay. *Small Ruminant Research* 19:9-14.
34. Kremer R, (2010). Producción de leche de calidad. Departamento Ovinos, Lanas y Caprinos. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Uruguay.p.1-64.
35. Labussiere JP, Marnet G, Combaud JF, Beaufile M, de la Chevalerie FA, (1993). Influence du nombre de corps jaunes sur la liberation docytocine luteale, le transfert du lait alveolaire dans la citerne et la production laitie`re chez la brebis. *Reproduction Nutrition Development* 33:383–393.
36. Labussiere JP, Marnet PG, de la Chevalerie FA, Combaud JF, (1996). Repetition de traitements progestatifs (FGA) et gonadostimulants (FSH et LH) pendant la phase descendante de la lactation de brebis lacauene. Effets sur la production ET la Composition du lait ET sur sa repartition alveolaire et citernale. *Annales de Zootechnie* 45:159–172.
37. Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RDJ, Weir CJ, Belelli D, (2009). Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABAA receptors. *Psychoneuroendocrino* 34: 48-58.
38. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM, (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004–1007.
39. Marnet PG, Negrao JA, Labussiere JP, (1998). Oxytocin release and milk ejection parameters during milking of dairy ewes in and out of natural season of lactation. *Small Ruminant Research* 28:183–191.
40. Martin P, (1984). Sub- Department of Animal Behaviour, University of Cambridge, Madingley, Cambridge CB3 8AA, U.K. Art. The Meaning of Weaning. *Review Animal Behaviour* 32(4):1257-1259.
41. Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ, (2000). Neuroendocrine responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Cambridge, Research Unit, Department of Animal Science, p.43-76.
42. McEwen BS, (2001). Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology* 91:2785-2801.
43. McKusick BC, Wiltbank MC, Sartori R, Marnet PG, Thomas DL, (2002). Effect of presence or absence of corpora lutea on milk production in East Friesian dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 85 (4):790-796.
44. Molina MP, (1987). Composición y factores de variación de la leche de oveja de Raza Manchega. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. p.219.
45. Moore NW, Holst PJ, (1967). The evaluation of progesterone- and SC-9880-impregnated intravaginal sponges used with PMS for the induction of breeding in the anoestrous crossbred ewe. En: T. J. Robinson (Ed.) *The Control of the*

- ovarian cycle in the Sheep. Sydney University Press, Sydney, Australia. p.133-134.
46. Napolitano F, De Rosa G, Sevi A, (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Animal Behaviour Science* 110:58–72.
 47. Napolitano F, Marino V, De Rosa G, Capparelli R, Bordi A, (1995). Influence of artificial rearing on behavioral and immune response of lambs. *Applied Animal Behavior Science* 45:245-253.
 48. Odensten MO, Berglund B, Persson Waller K, Holtenius K, (2007). Metabolism and Udder Health at Dry-Off in Cows of Different Breeds and Production Levels. *Journal of Dairy Science* 90:1417–1428.
 49. Olsen RW, Tobin AJ, (1990). Molecular biology of GABA receptors. *Faseb Journal* 4:1469-1480.
 50. Orgeur P, Bernard S, Naciri M, Nowak R, Schaal B, Lévy F, (1999). Psychobiological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reproduction Nutrition Development* 39:231-244.
 51. Orgeur P, Mavric N, Yvor P, Bernard S, Nowak R, Schaal B, Levy F, (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and immuno-pathological indicators of welfare. *Applied Animal Behavior Science* 58:87–103.
 52. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS, (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *American Journal of Physiology* 275:1247–1255.
 53. Patchev VK, Shoaib M, Holsboer F, Almeida OFX, (1994). The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 62:265-271.
 54. Pérez-León I, Orihuela A, Lidfors L, Aguirre V, (2006). Reducing mother young separation distress by inducing ewes into oestrous into day of weaning. *Animal Welfare* 15:383-389.
 55. Piccinato CA, (2008). Regulation of steroid metabolism and the hepatic transcriptome by estradiol and progesterone. Tesis de doctorado, University of Wisconsin Madison, Madison, Estados Unidos. 53 p.
 56. Pitcher B, Briefer E, Vannoni E, McElligott AS, (2012). Signals of quality and motivation in fallow deer (*Dama dama*). Session 18 – Dispersal. 14th Congress of the International Society for Behavioral Ecology. Lund University, Lund, Sweden p. 55-56.
 57. Pluchino N, Cubeddu A, Giannini A, Merlini S, Cela V, Angioni S, Genazzani AR, (2009). Progestogens and brain: update. *Maturitas* 62:349-355.
 58. Pulina G, Nudda A, (2004). Milk production. En: Pulina G (Ed.) Dairy sheep nutrition. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. p. 1-12.
 59. Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H, (2009). Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30:259–301.
 60. 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. *Animal Science* 66:397-402.

61. Robinson TJ, Smith JF, (1967). The evaluation of SC-9880-impregnated intravaginal sponges used with or without PMS for the advancement of the breeding season of british breed ewes. En: T. J. Robinson (Ed.) The control of the ovarian cycle in the sheep. Sydney University Press, Sydney, Australia. p. 144-157.
62. 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 aptive reindeer under defined feeding conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142:503-511.
63. Schams D, Lahlou-Kassi A, Glatzel P, (1982). Oxytocin concentrations in peripheral blood during the oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity. *Journal of Endocrinology* 92:9–13.
64. Speroff L, Glass RH, Kase NG, (1999). En: Mitchell C, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1133-1148.
65. Sphor L, Banchemo G, Correa G, Osório MTM, Quintans G, (2011). Early prepartum shearing increases milk production of wool sheep and the weight of the lambs at birth and weaning. *Small Ruminant Research*. 99:44-47.
66. Sphor L, Banchemo G, Correas G, Osório MTM, Quintans G, (2011). Early prepartum shearing increases milk production of wool sheep and the weight of the lambs at birth and weaning. *Small Ruminant Research* 99:44-47.
67. Stelwagen, K, Davis SR, Farr VC, Prosser CG, Sherlock RA, (1994). Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *Journal of Dairy Science* 77:426–432.
68. Sundstrom I, Backstrom T, Wang M, Olsson T, Seippel L, Bixo M, (1999). Premenstrual syndrome, neuroactive steroids and the brain. *Gynecologic Endocrinology* 13:206-220.
69. Ungerfeld R, (2002). Control endocrino del ciclo estral. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, 2v.
70. Van de Kar LD, Blair ML, (1999). Forebrain pathways mediating stressinduced hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:1–48.
71. Vilariño M, Rubianes E, Van Lier E, Menchaca A, (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small Ruminant Research* 91:219-224.
72. Wheaton JE, Carlson KM, Windels H, Johnston LJ, (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Animal Reproduction Science* 33:127-140.
73. Wieland S, Mirasedeghi S, Gee KW, (1991). Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5a-pregnan-3a-ol-20 one. *Brain Reserch* 565:263-268.
74. Wood PJ, Gower DB, (2010). Analysis of progestagens. En: Makin HLJ, Gower DB. *Steroid analysis*. Londres, Science+Business Media. p. 559-594.