

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“CAÍDA DE PROGESTERONA: RESPUESTA AL ESTRÉS DE AISLAMIENTO Y CAMBIOS
COMPORTAMENTALES EN BORREGAS EN ANESTRO”**

Por



CASSARINO PASTORINO, Magdalena ♦

MAGRI DANREÉ, Gabriela ♦

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**

2012



PÁGINA DE APROBACIÓN

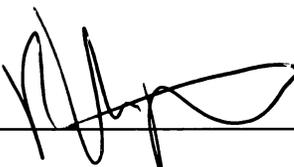
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Nombre completo y firma
S. CAVESTRAM

Segundo miembro (Tutor):



Nombre completo y firma

Tercer miembro:

ELIZE VAN LIER

Nombre completo y firma

Autores



Nombre completo y firma
MAGDALENA CASSARINO



Nombre completo y firma
Gabriela Maggi

Fecha:

24 / 4 / 2012

29 15 00

APROBADO POR: 
9 (nueve)

AGRADECIMIENTOS

FACI

Queremos brindar nuestros más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e Instituciones que de una forma u otra colaboraron en el desarrollo de esta Tesis:

En primer lugar a nuestros tutores Rodolfo Ungerfeld y Aline Freitas de Melo por toda la dedicación y apoyo brindado.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por las enseñanzas y experiencias brindadas durante estos años.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, especialmente a la Dra. Georget Banchemo por hacer posible de llevar a cabo este proyecto, y además a todo el grupo de trabajo (Juan Pablo, Laura, Florencia y Marcela).

Y en especial a nuestros familiares y amigos por acompañarnos siempre.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
1- Introducción general	9
2- Revisión bibliográfica.....	11
2.1- Ciclo estral y secreción de P4.....	11
2.2- Luteólisis y concentración de P4	11
2.3- Dispositivo intravaginal liberador de P4 (CIDR)	12
2.4- Influencias comportamentales de la P4	13
2.5- Respuesta de estrés.....	14
2.5.1- Concepto de estrés	14
2.5.2- Respuesta fisiológica de estrés.....	14
2.5.3- Cambios fisiológicos durante la respuesta de estrés.....	15
2.5.4- Indicadores de estrés.....	16
2.6- Test de aislamiento social (OFT).....	16
3- Hipótesis general:.....	18
4- Objetivo general:.....	18
4.1- Objetivos específicos:.....	18
5- Materiales y Métodos.....	18
5.1- Local de trabajo, animales, manejo y tratamiento	18
5.2- Experimento 1: OFT	19
5.2.1- Procedimientos experimentales del OFT	19

5.2.2- Comportamientos.....	19
5.2.3- Obtención de muestras sanguíneas.....	19
5.2.4- Cortisol	19
5.2.5- Mediciones hematológicas	20
5.2.6- Frecuencia cardíaca (FC)	20
5.2.7- Temperatura y Frecuencia respiratoria (FR)	20
5.3- Experimento 2: Comportamiento espontáneo	20
5.4- Análisis estadístico	20
5.4.1- Experimento 1	20
5.4.2- Experimento 2	20
6- Resultados.....	21
6.1- Experimento 1: OFT	21
6.1.1- Comportamientos.....	21
6.1.2- Frecuencia cardíaca	22
6.1.3- Frecuencia respiratoria	23
6.1.4- Temperatura superficial y rectal	24
6.1.5- Cortisol.....	28
6.1.6- Glucemia	30
6.2- Experimento 2: Comportamiento espontáneo	31
7- Discusión.....	34
8- Conclusiones	36
9- Bibliografía	37

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Patrón hormonal durante el ciclo estral en ovinos.....	6
Figura 2. Concentración sérica de P4 inducida por DICO® o CIDR-G.....	7
Figura 3. Frecuencia respiratoria	17
Figura 4. Temperatura.....	19
Figura 5. Efectos de la caída de P4 sobre la concentración sérica de cortisol.....	21
Figura 6. Efectos de la caída de P4 sobre la concentración de glucemia.....	22
Figura 7. Frecuencias comportamentales.....	24

TABLAS

Tabla 1. Efectos de la caída de P4 sobre el comportamiento durante el OFT.....	16
Tabla 2. Efectos de la caída de P4 sobre la frecuencia cardíaca durante el OFT.....	17
Tabla 3. Efectos de la caída de P4 sobre la frecuencia respiratoria durante el OFT.....	18
Tabla 4. Efectos de la caída de P4 sobre la temperatura superficial y rectal durante el OFT I....	18
Tabla 5. Efectos de la caída de P4 sobre la temperatura superficial y rectal durante el OFT II...20	
Tabla 6. Efectos de la caída de P4 sobre la concentración sérica de cortisol durante el OFT.....	21
Tabla 7. Efectos de la caída de P4 sobre la concentración de glucemia durante el OFT.....	22
Tabla 8. Efectos de la caída de P4 sobre las frecuencias comportamentales.....	23

RESUMEN

En los sistemas de producción ovina se realizan prácticas de manejo que generan estrés y que pueden afectar el bienestar animal. La respuesta de estrés puede estar influenciada por la progesterona (P4), ya que algunos de sus metabolitos tienen efectos ansiolíticos. Los objetivos de la tesis fueron determinar si la caída de P4 influye sobre: 1) la respuesta al test de aislamiento social, Open Field Test (OFT), mediante el análisis de las respuestas comportamentales, fisiológicas y hematológicas indicadoras de estrés, 2) la frecuencia de los comportamientos espontáneos. Para ello se utilizaron 40 borregas Ideal núlparas de 1 año de edad, de las cuales 20 fueron utilizadas en el experimento 1 (respuesta al estrés de aislamiento social luego de la caída de P4), y 20 en el experimento 2 (determinación de la frecuencia de comportamientos espontáneos durante y luego de la caída de P4). A 10 animales de cada experimento se les colocó un CIDR conteniendo 0,3 g de P4 (grupos P1 y P2) durante 13 días. Las 10 borregas de cada grupo control (C1 y C2) no recibieron tratamiento. El experimento 1 consistió en someter al grupo P1 (24 h luego de retirado el CIDR) y al grupo C1, al OFT, aislando al animal durante 10 minutos. Se analizaron los comportamientos a partir de filmaciones, se registraron las frecuencias cardíaca (FC) y respiratoria (FR), temperatura rectal y superficial, y se obtuvieron muestras de sangre midiendo el cortisol y la glucemia, antes y después del OFT. En el experimento 2, se realizaron observaciones tipo scan, cada 10 minutos, 3 h en la mañana y 3 h en la tarde, durante tres periodos experimentales: 1) 2 y 1 día antes de colocar los CIDRs a las borregas el grupo P2, 2) los días 10, 11 y 12 del tratamiento con CIDR, y 3) dos días luego de la retirada de los mismos a las borregas P2 y C2. Se registraron los comportamientos espontáneos (parados, echados, caminando, pastando o rumiando). En el experimento 1 las borregas P1 tendieron a tener mayores niveles máximos de cortisol ($7,6 \pm 0,5$ ng/dl) y mayor concentración sérica luego del test. La glucemia antes del OFT fue más alta en el grupo P1 ($47,4 \pm 1,9$ µg/dl) que en C1 ($42,2 \pm 1,7$ µg/dl) y al finalizar el muestreo la glucemia del de P1 ($54,9 \pm 5,4$ µg/dl) tendió a ser más alta que C1 ($45,9 \pm 4,6$ µg/dl). Las borregas P1 alcanzaron la FR máxima ($60,8 \pm 11$ mpm) antes que C1, y al salir del OFT la FR también fue mayor en P1. No hubieron diferencias entre los grupos en la FC y los comportamientos. En el experimento 2, P2 presentó mayor frecuencia de observaciones caminando y menor frecuencia paradas en comparación a C2. Finalmente se concluyó que la respuesta al test de aislamiento social fue mayor luego de la caída de P4, demostrando una mayor respuesta de estrés. Además, la disminución brusca de P4 generó cambios en los comportamientos espontáneos reflejando mayor ansiedad.



ABSTRACT

Del

In sheep production systems, most of management practice creates stress which can affect animal wellbeing. The stress response can be influenced by progesterone (P4), as some of its metabolites possess anxiolytic effects. The aim of this study was to determine whether the abrupt decline of P4 influences: 1) the response to the Open Field Test (OFT), including behavioral parameters, endocrine and hematological indicators of stress; and 2) the frequency of spontaneous behaviors. To fulfill the targets, 40 nulliparous ewes Ideal age of 1 year were used, of which 20 were for in experiment 1 (isolation stress response after the decline of P4) and 20 for experiment 2 (determination of the frequency of spontaneous behavior during and after the decline of P4). In each experiment 10 animals were fitted with a CIDR containing 0.3 g of P4 (P1 and P2 groups) during 13 days. The 10 ewes of the control groups (C1 and C2) did not receive any treatment. Experiment 1 consisted of subjecting the group P1 (24h after removal of the CIDR) and the group C1, to the OFT, where they were isolated for 10 minutes. Behaviors were recorded during the test and were analyzed parameters such as heart rate (FC), breathing (FR), temperature, analysis of blood samples (cortisol, glucose) before and after the OFT. In experiment 2 an observation of spontaneous behavior was made every 10 minutes, 3 h in the morning and 3 h in the afternoon, in three experimental periods: 1) 2 and 1 day before placing CIDR to group P2, 2) on days 10, 11 and 12 of treatment with CIDR, and 3) two days after the withdrawal of the CIDR to groups C2 and P2. In experiment 1, P1 tended to have higher cortisol levels ($7,6 \pm 0,5$ ng/dl) and higher maximum serum concentration after the test. Blood glucose before the OFT was higher in group P1 ($47,4 \pm 1,9$ μ g/dl), and at the end of sampling P1 ($54,9 \pm 5,4$ μ g/dl) blood glucose tended to be higher than C1 ($45,9 \pm 4,6$ μ g/dl). Ewes on P1 reached the maximum FR ($60,8 \pm 11$ mpm) before C1, and at the end of the OFT the FR was also higher in P1. There were no differences in the register of FC and behavior between groups. In experiment 2, the results showed that the P2 group demonstrated greater 'walking' behavior and less 'standing' behavior in comparison with C2. Finally it was concluded that the abrupt decline of P4 generates greater stress response to isolation, explained by higher basal levels of cortisol and glucose and that it generate changes in spontaneous behavior that reflected anxiety.

1- Introducción general

En los sistemas de producción ovina se realizan diversas prácticas de manejo (como la señalada, castración, vacunaciones, mezcla de diferentes grupos sociales y transporte) que generan estrés (ver revisión Burdick *et al.*, 2010). Los niveles altos de estrés están relacionados con un bienestar animal pobre (Moberg, 2000). El bienestar puede ser definido como la capacidad del animal de adaptarse al medio ambiente (Broom, 1986); y se caracteriza por controlar mediante la respuesta de estrés los efectos de los estímulos estresores, permitiendo una mejor adaptación del individuo a su ambiente (Moberg, 2000). Por este motivo se torna útil desarrollar herramientas que logren disminuir el estrés al que son sometidos los animales, mejorando así su bienestar, y probablemente los resultados productivos (Lynch *et al.*, 1992).

Existe una amplia variedad de estímulos estresores, tanto intrínsecos como extrínsecos al animal, que pueden generar diferentes grados de respuesta de estrés. La magnitud de esta respuesta puede ser modulada por factores intrínsecos del animal, como es el caso de la progesterona (P4). Se ha reportado que algunos de los metabolitos de la P4 actúan mitigando la respuesta de estrés (ver revisiones: Barbaccia *et al.*, 1998; Smith, 2007). En este sentido, Vierin y Bouissou (2001) encontraron una menor respuesta de estrés al test de aislamiento social, Open Field Test (OFT) en ovejas gestantes que en ovejas vacías. Además, altos niveles de P4 tienen efectos inhibitorios sobre el comportamiento agresivo (hamster: Fraile, *et al.*, 1986), y actúa como ansiolítico e hipnótico (humanos: Vincens *et al.*, 1989). Por lo mismo, la disminución brusca de P4 implica la desaparición aguda de ese mecanismo inhibitorio, lo que se ha demostrado que incide en el aumento en los comportamientos que acompañan a la ansiedad (ratas: Gallo y Smith, 1993).

La P4 es una hormona secretada por el cuerpo lúteo (CL), siendo necesaria para que se desarrolle la preñez. Además del CL, también es secretada por la unidad fetoplacentaria (Ungerfeld, 2002), el sistema nervioso periférico, las gónadas, glándulas adrenales, y por neuronas y células de la glía (Baulieu 1980, 1991 citado por Frye *et al.*, 2011). Algunos de sus metabolitos ejercen un efecto inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC), ya que los mismos ejercen efectos anestésicos (Mok *et al.*, 1993; Camacho *et al.*, 1995). Normalmente, las concentraciones de esta hormona varían a lo largo del ciclo estral, siendo máximas en la fase luteal y mínimas en la fase folicular (Ungerfeld, 2002). Por lo tanto, las fluctuaciones naturales de P4 durante el ciclo estral, o las generadas por tratamientos hormonales, pueden determinar diferencias en las respuestas de estrés. En función de esto, se planteó estudiar si la disminución de la concentración de P4 genera cambios en los patrones comportamentales, así como una mayor sensibilidad en la respuesta de estrés de las borregas.

Para mejor entendimiento de los objetivos, en la revisión bibliográfica serán tratados los siguientes temas: ciclo estral y secreción de P4; luteólisis y concentración de P4;

dispositivo intravaginal liberador de P4 (CIDR); influencias comportamentales de la P4; repuesta de estrés; y test de aislamiento social (OFT).

2- Revisión bibliográfica

2.1- Ciclo estral y secreción de P4

La oveja es una especie poliéstrica estacional, lo que significa que tiene ciclos estrales sucesivos durante una estación del año, estación reproductiva, en la que se producen los apareamientos; esta estación puede durar, dependiendo de la raza, de 3 a 10 meses (Lees, 1969 citado por Noakes *et al.*, 2001). El principal estímulo para que comience la estación reproductiva es la disminución de la cantidad de horas de luz durante el día (Lees, 1969 citado por Noakes *et al.*, 2001). La duración del ciclo estral es de 17 días, siendo la fase folicular de aproximadamente 4 días y la fase luteal de 12-13 días (Ungerfeld, 2002). La fase folicular incluye todo el crecimiento folicular, hasta su desarrollo final (folículo preovulatorio), finalizando con la ovulación (Ungerfeld, 2002) (Figura 1). Las células del folículo comienzan a crecer y a dividirse durante el periodo de desarrollo folicular para convertirse en células de la granulosa. También existen unas células fusiformes que se organizan alrededor de la membrana basal del mismo que se denominan células de la teca (Stabenfeldt y Edquist, 1999). A partir de la ovulación ocurren cambios en el folículo: la granulosa pierde la capacidad de secretar estrógenos (E2) y empieza a liberar P4 (Hansel y Fortune, 1978 citado por Ungerfeld 2002). La fase luteal se inicia con la formación del CL por el estímulo de la hormona luteinizante (LH) (Stabenfeldt y Edquist, 1999). La luteinización se caracteriza por un aumento de tamaño de las células de la granulosa: en el principio, a medida que el CL se desarrolla aumenta la cantidad de P4 secretada (Ungerfeld, 2002). El CL está formado básicamente por 2 tipos de células diferentes: las grandes (derivadas de las células de la granulosa), y las pequeñas (derivadas de las células de la teca), ambas secretoras de P4, siendo las grandes la responsable de la mayor secreción (Ungerfeld, 2002).

2.2- Luteólisis y concentración de P4

La luteólisis es la muerte de las células luteales, lo que determina la disminución de las concentraciones sanguíneas de P4 (día 13-14 del ciclo estral) (Ungerfeld, 2002). La principal hormona luteolítica es la prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), producida por el endometrio luego de que hubiera recibido un impacto previo de P4 durante determinada cantidad de días. El aumento de los E2 secretados por un folículo en desarrollo sensibiliza al endometrio a secretar PGF2 α al estimular la síntesis de receptores de oxitocina en el mismo, siendo esta la principal hormona estimuladora de la secreción de PGF2 α (Ungerfeld, 2002). La P4 secretada por el CL ejerce una retroalimentación negativa sobre la frecuencia de los pulsos de GnRH, inhibiendo la pulsatilidad de la LH, por lo tanto la secreción de E2, e indirectamente, hasta la fase luteal tardía, la de PGF2 α (Ungerfeld, 2002). La luteólisis se desencadena por la retroalimentación positiva entre oxitocina luteal y PGF2 α endometrial (Ungerfeld, 2002). Dicha retroalimentación al principio de la fase luteal se encuentra inhibida por la presencia de la P4, y el primer estímulo para que comience este proceso es la secreción de oxitocina hipofisaria (Ungerfeld, 2002). La figura 1 representa

esquemáticamente las variaciones de las diferentes hormonas a lo largo del ciclo estral.

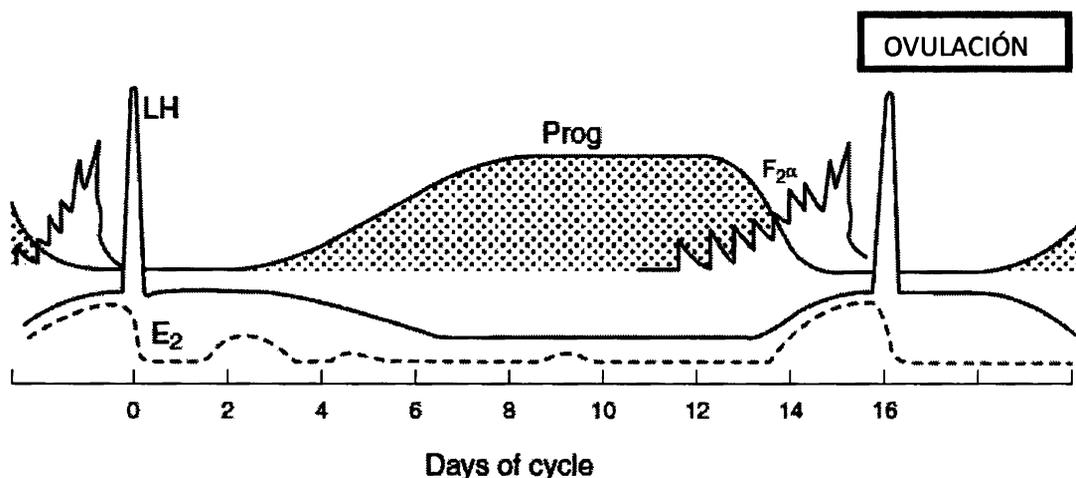


Figura 1: Representación esquemática del patrón de progesterona (Prog), LH, estradiol (E₂) y de la secreción de PGF_{2α} (F_{2α}), y de la secuencia de relaciones que determina la sincronización de los eventos más importantes durante el ciclo estral en ovinos (Modificada de Goodman e Inskeep, 2006).

2.3- Dispositivo intravaginal liberador de P4 (CIDR)

El CIDR es un dispositivo intravaginal de elastómero de silicona impregnado con 0,3 g de P4, utilizado principalmente para sincronizar los celos de las ovejas (Wheaton *et al.*, 1993). Luego de la inserción de un CIDR la concentración sérica de P4 aumenta rápidamente, alcanzando un pico el primer día (ver figura 2). A partir de este momento la concentración de P4 decrece paulatinamente (Vilariño *et al.*, 2010). Las concentraciones de P4 séricas alcanzadas son similares a las registradas en una fase luteal. Como se mencionó anteriormente, en ovejas cíclicas la concentración de P4 disminuye rápidamente luego del comienzo de la luteólisis. Del mismo modo, luego de la retirada de un CIDR utilizado por 14 días en ovejas ovariectomizadas, se observa una caída brusca en la concentración sérica de P4, similar a la observada en la luteólisis, llegando a niveles basales a las 24 h (Vilariño *et al.*, 2010) (Figura 2).

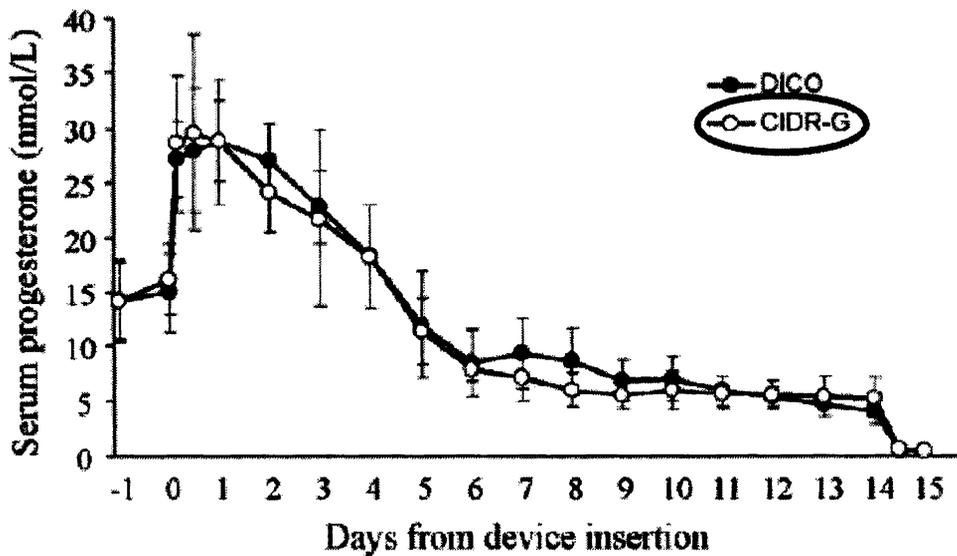


Figura 2: Concentración sérica de progesterona (media \pm SD) inducida por DICO[®] o CIDR-G[®] durante un tratamiento de 14 días en ovejas ciclando (Tomado de Vilariño *et al.*, 2010).

2.4- Influencias comportamentales de la P4

Los metabolitos de la P4 con grupo 3 α -hydroxy en su estructura molecular, son considerados neuroesteroides que actúan como moduladores alostéricos positivos en el receptor GABA, generando efectos ansiolíticos, sedativos, anestésicos y anticonvulsivantes (humano: Andréen *et al.*, 2009; bovino: Hawkinson *et al.*, 1994; ovino: Crossley *et al.*, 2000; 2003; rata: Bitran *et al.*, 1991; 1993; ratón: Wieland *et al.*, 1991; conejillo de Indias: Landgren, 1991). Considerando que inmediatamente de la luteólisis o de la retirada de un CIDR se produce una disminución en la concentración sérica de P4, podrían generarse cambios comportamentales relacionados a la ansiedad. Existen algunos trabajos que relacionan la caída de P4 con el aumento de la ansiedad en roedores (meriones: Starkey y Bridges, 2010; ratas: Gallo y Smith, 1993; Löfgren *et al.*, 2006 y 2009).

En ovejas ciclando, la caída de P4 es seguida de un aumento de los E2, y por tanto del comportamiento de celo (Ungerfeld, 2002). El comportamiento de celo, enmascara posibles efectos generados de por sí por la caída de la P4. En cambio, en el último ciclo estral antes del anestro, la caída de P4 no es seguida de un aumento de E2 tan intenso como los de una fase folicular de un ciclo estral normal. Una alternativa para evitar la superposición de la caída de P4 con el aumento de E2, es utilizar animales en anestro a los que se les administre P4.

2.5- Respuesta de estrés

2.5.1- Concepto de estrés

Cannon (1939, citado por Kunert 2007), propuso que la estabilidad del medio interno de un organismo multicelular, a la que llamó homeostasis, se logra por medio de un sistema de procesos fisiológicos coordinados que se oponen a los cambios; la homeostasis comprendería la resistencia a las perturbaciones tanto internas como externas al organismo (Kunert, 2007).

El término estrés se refiere al efecto de estímulos adversos que perturban gravemente la homeostasis (Gómez y Escobar, 2006). Los estímulos adversos son denominados estresores y la reacción por parte del animal, respuesta de estrés (Carlson, 1998). Seyle (1974, citado por Kunert, 2007) planteó que no todos los tipos de estrés son perjudiciales, por lo que propuso los términos eustrés y distrés. Estos términos ayudan a diferenciar entre una respuesta sin amenaza a la integridad física del animal, la que le permite adaptarse al medio (eustrés), de una respuesta al estrés que produzca cambios deletéreos en su estado biológico (distrés) (Moberg, 2000).

Los animales han evolucionado hacia mecanismos intrínsecos para lidiar con el estrés de corto tiempo (agudo) que minimizan el costo biológico (Rushen, 2000). Este tipo de estrés, leve, breve y controlable, podría incluso considerarse como un estímulo positivo para el crecimiento, desarrollo emocional e intelectual, ya que no dura lo suficiente como para causar daño a los tejidos vitales (Broom y Kirkden, 2004).

De modo contrario, las situaciones de estrés prolongadas (crónicas) pueden transformarse en una amenaza a la homeostasis (Moberg, 2000). Aunque los efectos de corto plazo de las hormonas secretadas durante la respuesta de estrés son esenciales, sus efectos a largo plazo resultan dañinos para el organismo; estos efectos incluyen el aumento de la presión sanguínea, daños al tejido muscular, infertilidad, inhibición del crecimiento, inhibición de la respuesta antiinflamatoria e inhibición de la respuesta inmunológica (Carlson 1998).

2.5.2- Respuesta fisiológica de estrés

Según Seyle (1950, citado por Nelson, 2000) la respuesta a un estresor implica 3 pasos: la reacción de alarma, la resistencia, y la fase exhaustiva (síndrome general de adaptación). El primer paso se caracteriza por una estimulación generalizada del sistema nervioso simpático (SNS) y del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA). En la fase de resistencia, el organismo selecciona los canales más efectivos y económicos de defensa (Kunert, 2007). Si el factor generador de estrés se mantiene en el tiempo, o supera la capacidad del organismo para defenderse, comienza la fase exhaustiva, en la que se agotan los recursos y aparecen signos de "gasto y desgaste" o de daño sistémico (Seyle, 1974 citado por Kunert, 2007).

La respuesta biológica que se desencadena una vez que el SNC percibe el estrés, incluye la integración compleja de cuatro respuestas generales de defensa: la de los sistemas nervioso autónomo (SNA), endócrino, inmune y la respuesta comportamental (Moberg, 2000; Gómez y Escobar, 2006). Estas respuestas generales se basan en la comunicación a lo largo de las vías neuronales entre corteza cerebral, sistema límbico, tálamo, hipotálamo, hipófisis y sistema reticular activador (SRA) (Kunert, 2007). La corteza cerebral participa en la vigilancia, cognición y atención enfocada. El sistema límbico es el responsable de los componentes emocionales, como excitación y miedo (Kunert, 2007). El tálamo funciona como centro de transferencia y es importante en la recepción, ordenamiento y distribución de las aferencias sensitivas. El hipotálamo coordina las respuestas del SNA y secreta el factor liberador de corticotrofina (CRH) el cual estimula a la hipófisis a liberar la hormona adenocorticotropina (ACTH) (Sapolsky, 2002). Por otra parte el SRA genera una tensión musculoequelética debido a su influencia en los circuitos reflejos que controlan el tono muscular (Kunert, 2007).

Las respuestas autónomas y endócrinas que acompañan al estrés generan efectos catabólicos (Carlson, 1998): se estimula la rama simpática del SNA, lo que determina que se secrete adrenalina, noradrenalina y hormonas esteroideas (cortisol, aldosterona y testosterona) por parte de las glándulas adrenales (Carlson, 1998). Esta manifestación del SNA, por medio del SNS, fue utilizada por Cannon (1929) para explicar el principio de la respuesta de "lucha o huida" durante la respuesta de estrés (Moberg, 2000). La adrenalina estimula la glucólisis y la lipólisis (Nelson y Cox, 2009), promueve el uso de glucosa en los músculos estriados, además de actuar en asociación con la noradrenalina haciendo aumentar el flujo sanguíneo en los músculos estriados a partir de un aumento en la frecuencia cardíaca (Carlson, 1998).

Uno de los factores endócrinos fundamentales en la respuesta de estrés es la secreción de glucocorticoides como el cortisol por parte de la glándula adrenal al ser estimulada por la ACTH. El cortisol, actúa simultáneamente como mediador e inhibidor de la respuesta de estrés, de forma evitar la activación excesiva (Kunert, 2007).

2.5.3- Cambios fisiológicos durante la respuesta de estrés

Como se mencionó anteriormente, luego de una situación de estrés hay un aumento de cortisol, el que participa en la mantención de los niveles de glucemia ya que estimula la gluconeogénesis, la degradación endógena de proteínas y la lipólisis (Nelson y Cox, 2009). Además, este corticosteroide refuerza el efecto de las catecolaminas sobre el sistema cardiovascular, contribuyendo con el aumento de la frecuencia cardíaca y flujo sanguíneo en los músculos estriados (Kunert, 2007). También se mencionaron los efectos perjudiciales de este corticosteroide para el organismo entre los que se encuentra la inhibición de la actividad osteoblástica, de la hematopoyesis, de la síntesis de proteínas y colágeno, así como también la disminución de la respuesta inmunitaria ya que los sistemas neuroendocrino e

inmune comparten vías de señales comunes y las hormonas pueden alterar la función de las células de cada sistema (Falaschi *et al.*, 1994 citado por Kunert, 2007).

Pierzchala *et al.*, (1985) y Niezgodá *et al.*, (1987) encontraron que la glucemia aumenta durante la respuesta de estrés (Apple *et al.*, 1993), aunque el aumento es mínimo con episodios de estrés repetidos (Niezgodá *et al.*, 1987 citado por Apple *et al.*, 1993). Además de la glucosa, la insulina y el lactato en borregas también aumentan en animales sometidos a un estímulo estresor (Apple *et al.*, 1995). Durante la respuesta de estrés, el aumento de la actividad simpática genera un aumento de la vigilancia, la cognición y la atención focalizada; un aumento de las frecuencias cardíacas y respiratorias, la dilatación de las pupilas, además de hiposalivación y la disminución de la actividad gastrointestinal (Kunert, 2007).

En resumen, los mecanismos del animal para responder a un estresor generan activación de algunos sistemas que posibilitan un aumento del flujo sanguíneo, de la energía y de oxígeno, e inhiben otros como la reducción en los procesos de digestión, crecimiento, inmunidad y reproducción (Nelson, 2000). Existe un aumento de la vigilancia y del funcionamiento cognitivo que permite el procesamiento rápido de la información y la obtención de una solución apropiada para la situación amenazante, llevando al animal a decidir entre luchar o huir (Kunert, 2007).

2.5.4- Indicadores de estrés

Los animales responden a un estímulo estresante con cambios comportamentales, fisiológicos y hormonales. Dentro de los cambios comportamentales se pueden considerar diferentes indicadores como ser el nivel de actividad, la postura, vocalizaciones, agresividad y el consumo de alimento (Squires, 2003). Los cambios fisiológicos incluyen un aumento en el número de eliminaciones (micción y defecación) (Romeyer y Bouissou, 1992; Bouissou y Vandenheede, 1995), un aumento de la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y la presión sanguínea en caso de que se trate de un estímulo agudo (Squires, 2003). Los cambios hormonales incluyen la actividad del eje HHA, lo que se evidencia por un aumento en los niveles de ACTH y del cortisol sanguíneo (Squires, 2003).

Uno de los métodos más utilizados para medir la respuesta de estrés es la colección de sangre por venopunción para medir los niveles sanguíneos de cortisol (Mostl y Palme, 2002). Una desventaja en utilizar este método es que al ser una técnica invasiva, la misma colecta de sangre genera cierto estrés que puede interferir con los resultados (Mostl y Palme, 2002).

2.6- Test de aislamiento social: Open Field Test

El OFT fue desarrollado originalmente para evaluar la respuesta de miedo en ratones (Hall, 1936 citado por Rushen, 2000). Este test también puede ser utilizado en rumiantes con el objetivo de determinar las respuestas al estrés de aislamiento social (Kilgour, 1975 citado por Rushen, 2000). Algunos trabajos utilizaron la oveja

como modelo experimental (Ferreira *et al.*, 1992; Roemeyer y Boissou 1992, Bouissou y Vandenheede 1995; Bouissou *et al.*, 1996; Pedernera-Romano *et al.*, 2010), ya que al ser una especie de hábito gregario el aislamiento social es un fuerte estresor (Lynch, *et al.*, 1992). El OFT es una prueba que ya fue utilizada con éxito para estudiar los efectos de la P4 (Heinsbroek *et al.*, 1988 y Löfgren *et al.*, 2006 y 2009).

El OFT consiste en someter al animal a un estrés de aislamiento social, lo que genera una respuesta aguda de estrés (Forkman *et al.*, 2007). Se introduce al animal individualmente en un área desconocida (encerrada por paredes, con espacio para su locomoción, y con el piso marcado con cuadrantes), aislada de cualquier otro animal por un determinado tiempo (varía de acuerdo a la especie y objetivo del estudio), donde pueden registrarse parámetros comportamentales que reflejan miedo (vocalización, micción, defecación e inmovilizaciones) (Acher, 1973 citado por Rushen, 2000), exploración (olfateos y lamidos), y locomoción (numero de cuadrantes cruzados) (Forkman *et al.*, 2007). Se considera que los animales con mayores frecuencias de vocalización, defecación y menores frecuencias de comportamientos exploratorios y actividad de locomoción responden con mayor nivel de estrés (Moberg *et al.*, 1980).

Además de los parámetros comportamentales, es posible determinar cambios endócrinos y fisiológicos relacionados a la respuesta de estrés de aislamiento social (concentración de cortisol y glucemia, frecuencia cardíaca y respiratoria, y temperaturas rectal y superficial). Damián (2011) observó un aumento en los valores de todas esas variables en carneros luego del OFT.

3- Hipótesis general:

La disminución brusca de la concentración de P4 genera cambios comportamentales (relacionados con la ansiedad) y una mayor respuesta al estrés de aislamiento social (OFT) en borregas.

4- Objetivo general:

Determinar si la disminución brusca de la concentración de P4 generada por la utilización y retirada de un CIDR en borregas en anestro, afecta el comportamiento y la repuesta al OFT.

4.1- Objetivos específicos:

Determinar si la caída de P4 influye sobre:

- La respuesta al OFT, incluyendo los parámetros comportamentales, endócrinos y hematológicos indicadores de estrés.
- La frecuencia de los comportamientos: echado, parado, caminando, pastando, rumiando, tomando agua, frecuencia de micción y defecación, y cambio de posición (echado/parado).

5- Materiales y Métodos:

5.1- Local de trabajo, animales, manejo y tratamiento

El trabajo fue realizado en la estación “La Estanzuela” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en Colonia (34° 28' S; 57° 51' O), Uruguay, fuera de la estación reproductiva (setiembre-octubre). Fueron utilizadas 40 borregas Ideal nulíparas de un año de edad, esquiladas, que fueron adjudicadas a 4 grupos homogéneos según el peso ($40,3 \pm 0,6$ kg; media \pm SEM), condición corporal ($2,11 \pm 0,03$; escala 1-5), espesura de grasa ($3,6 \pm 0,1$ mm), y área de ojo de bife ($12,4 \pm 0,3$ mm). De ellas, 20 fueron utilizadas en el Experimento 1 (OFT) y 20 en el Experimento 2 (Comportamiento).

Los animales permanecieron en cuatro potreros de 50 X 25 m, separados entre sí durante 3 días anteriores a los experimentos, con agua *ad libitum* y pradera de trébol rojo y alfalfa.

A 10 animales de cada experimento se les colocó un CIDR (Pfizer, Nueva Zelanda) conteniendo 0,3 g de P4 (grupos P1 y P2) durante 13 días. A las 10 borregas de cada grupo control (C1 y C2) no se les realizó ningún tratamiento.

5.2- Experimento 1: OFT

5.2.1- Procedimientos experimentales del OFT

Cuatro días antes del OFT los grupos P1 y C1 fueron llevados a dos corrales (con agua y heno de alfalfa), separados y ubicados en las proximidades de donde fue realizado el OFT, a fin de evitar el cambio brusco de ambiente previo al test. Ambos grupos fueron sometidos al OFT 24 h luego del retiro de los CIDRs de grupo P1.

El test consistió en aislar a las borregas en forma individual, durante 10 minutos, en un área novedosa (con piso de 3,4 X 3,5 m, dividido en 16 cuadrantes de 85 cm, con paredes blancas de 1,55 m de altura). Durante el test no permaneció ninguna persona a menos de 20 m y se registraron las actividades de los animales mediante dos cámaras de video (Sony, DCR-SR85, China) ubicadas en diferentes ángulos. Los tests se realizaron en dos mañanas (8:00-13:00h), intercalando cada día 5 borregas de cada grupo. Luego de realizado el test las borregas fueron alojadas en otro corral en el que siempre hubo animales de la misma majada.

5.2.2- Comportamientos

A partir de los videos, se registró el número de olfateos, inmobilizaciones, intentos de escape, vocalización y eliminación. Además se determinó el tiempo a la primera vocalización, defecación y micción, el número de líneas divisorias cruzadas y el tiempo que permaneció en los cuadrantes de la periferia.

5.2.3- Obtención de muestras sanguíneas

Todas las muestras fueran colectadas por venopunción yugular. La primer muestra fue colectada 5 minutos antes del OFT (tiempo -5), seguida de la segunda muestra, que fue colectada luego del OFT (tiempo cero) y a los 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min del OFT. En todos los tiempos las muestras colectadas fueron colocadas en tubos sin anticoagulante. En los tiempos -5, 0, 30, 60 y 120, también se colocó sangre en un tubo con anticoagulantes (fluoruro de sodio).

Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas por 10 min a una velocidad de 4000 rpm, y se separó el suero o el plasma, los que fueron almacenados a -20°C hasta las respectivas mediciones.

5.2.4- Cortisol

Los niveles de cortisol sérico fueron determinados en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay). La determinación de cortisol se realizó utilizando un kit comercial de fase sólida (TKPG, Count-A-Count, Siemens, Los Angeles, CA, EEUU). La sensibilidad analítica del ensayo fue 0,65 nmol/L. El coeficiente de variación intraensayo para el control medio (5 nmol/L) fue de 12%.

5.2.5- Mediciones hematológicas

En las muestras de plasma extraídas de los tubos con fluoruro de sodio se determinó la glucemia (método de glucosa oxidasa/peroxidasa).

5.2.6- Frecuencia cardíaca (FC)

La FC fue registrada de forma continua con un polar (Transmisor codificado Polar Equine T54H con un monitor RS400), que fue colocado en el tiempo -5 y retirado 15 minutos después del test. Se utilizó el software Polar Pro Trainer 5, determinándose la FC antes del OFT, máxima al OFT, luego del OFT y el tiempo para volver a la FC antes del test.

5.2.7- Temperatura y Frecuencia respiratoria (FR)

La temperatura rectal fue medida con un termómetro digital, y las temperaturas superficiales fueran medidas con un termómetro laser (IR-102 Infrared Thermometer, Super Elec. Equip. Co, China) en las zonas cardiaca, pared abdominal y perineo, a los -5, 0, 10, 20, 30, 45 y 60 min. La FR fue registrada por conteo de los movimientos torácicos durante 30 segundos y duplicados para obtener la variable "movimientos por minuto" (mpm), a los -5, 0, 10, 20, 30, 45 y 60 min.

5.3- Experimento 2: Comportamiento espontáneo

Los dos grupos de borregas C2 y P2, fueron mantenidos en potreros diferentes de 50 X 45 m, ubicados uno al lado de otro, accediendo a la misma pastura, y con libre acceso a bebederos. Los potreros fueron cambiados fuera de los períodos de observaciones y registros comportamentales de acuerdo a las necesidades de la pastura. Las observaciones y registros comportamentales fueron realizadas en tres periodos experimentales: 1) 2 y 1 día antes de colocar los CIDRs a las borregas del grupo P2, 2) los días 10, 11 y 12 del tratamiento con CIDR, y 3) dos días luego de la retirada de los mismos.

Se realizaron observaciones tipo scan, cada 10 minutos, en la mañana (8:00-11:00 h) y en la tarde (15:30-18:30h), registrando cada vez que los animales estaban parados, echados, caminando, pastando o rumiando. En los períodos 2 y 3, se realizó observación focal del grupo, simultáneamente a los scans, registrándose el número de veces en que el animal cambia de posición (echado/parado), toma agua, orina y defeca.

5.4- Análisis estadístico

5.4.1- Experimento 1

Las variables que se midieron en forma repetida en el tiempo (FR, temperatura, cortisol y variables hematológicas) fueron comparadas por un ANOVA para

mediciones repetidas. Los valores de concentración de cortisol fueron transformados por $\log(x + 1)$ para normalizar los residuos previos al análisis. Las variables comportamentales registradas durante el OFT y los parámetros analizados de la FC, presentaron distribución normal y fueron comparadas con un test de t. Las probabilidades menores 0,05 son consideradas diferencias estadísticas, las probabilidades menores a 0,10 son consideradas tendencias, mientras aquellas robabilidades mayores a 0,05 no son consideradas como diferencias significativas.

5.4.2- Experimento 2

Se calculó el porcentaje de observaciones diarias en que cada animal realizó cada comportamiento (parado, echado, caminando, pastando y rumiando). Para el período 1 (previo a la colocación de los CIDRs) se calculó el valor medio de los 2 días para cada animal, para luego comparar los valores de los 2 grupos experimentales con un test de t. Para los datos obtenidos durante el período sin CIDR y con CIDR se consideró el valor medio de los diferentes días, y este se incluyó en un ANOVA para mediciones repetidas junto a los datos de los 2 días luego del retiro del CIDR. Los registros de las observaciones focales no presentaron distribución normal, por lo que fueron comparados por test de U de Mann-Whitney.

6- Resultados

6.1- Experimento 1: OFT

6.1.1- Comportamientos

Los grupos P1 y C1 no presentaron diferencias en ninguno de los comportamientos registrados durante el OFT (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de la caída de progesterona sobre el comportamiento de borregas en anestro durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm SEM). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Actividades	C1	P1
Nº total de cruces	53,4 \pm 4,4	56,3 \pm 6,7
Nº de cruces de la periferia	41,1 \pm 2,7	36,8 \pm 4,1
Nº de Olfateos	23,1 \pm 3,6	20,9 \pm 3,0
Nº de Intentos de escape	2,4 \pm 2,2	0,2 \pm 0,1
Nº de Inmovilizaciones	32,1 \pm 2,5	31,9 \pm 4,3
Nº de Eliminaciones	0,4 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1
Nº de Balidos	31,7 \pm 7,6	27,4 \pm 6,6
Tiempo en la periferia (seg)	473,3 \pm 32,4	433,3 \pm 36,9
Tiempo a la primera eliminación (seg)	414,5 \pm 81,8	255,7 \pm 87,6
Tiempo al primero balido (seg)	198,2 \pm 75,2	151,6 \pm 75,6

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento.

6.1.2- Frecuencia cardíaca

Los grupos P1 y C1 no presentaron diferencias significativas en la FC antes del OFT, FC máxima durante el OFT, FC luego del OFT, ni en el tiempo para volver a la FC observada antes del test (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos de la caída de progesterona sobre la frecuencia cardíaca (latidos/min) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm SEM). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Frecuencia Cardíaca	C1	P1
Antes del OFT	120,0 \pm 9,7	116,8 \pm 5,4
Máxima en el OFT	226,4 \pm 2,2	222,7 \pm 3,4
Luego del OFT	202,8 \pm 28,9	203,7 \pm 7,2
Tiempo para volver a la FC antes del OFT (seg)	1.187,1 \pm 105,3	1.072,0 \pm 103,6

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; OFT: Open Field Test; FC=frecuencia cardíaca.

6.1.3- Frecuencia respiratoria

Para los registros de FR, hubo efecto del tiempo ($P < 0,01$) y una tendencia para la interacción grupo \times tiempo ($P = 0,08$), pero no hubo efecto de grupo. La FR es presentada en la Figura 3. Los parámetros analizados de la FR son presentados en la Tabla 3. Las borregas P1 alcanzaron a la FR máxima antes que el C1 ($P < 0,0001$), y al salir del OFT la FR del grupo P1 tendió a ser mayor que la del C1 ($53,2 \pm 6,1$ vs $41,2 \pm 1,9$; $P = 0,07$).

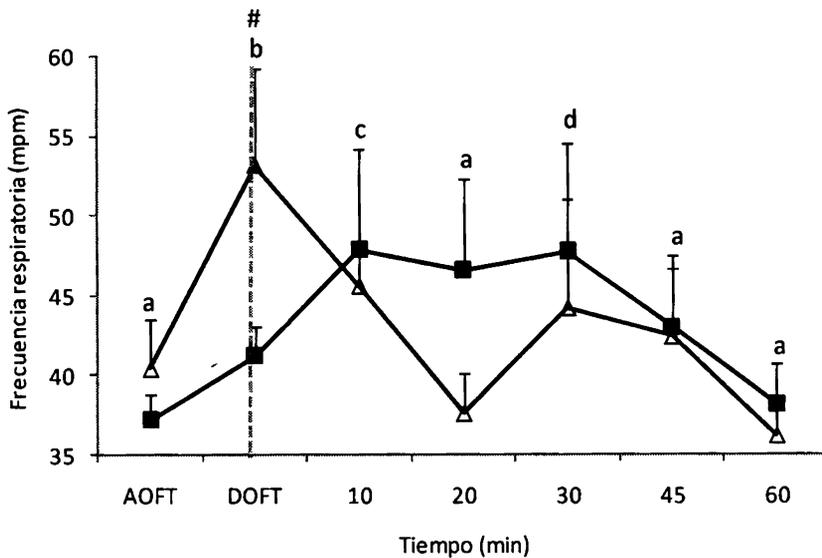


Figura 3. Frecuencia respiratoria. Los símbolos corresponden a: Δ: grupo tratamiento; ■ grupo control. Las borregas de grupo tratamiento utilizaron un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test. La línea punteada representa el tiempo de salida del Open Field Test. AOFT: tiempo antes de entrar al test; DOFT: tiempo de salida del test. Diferentes letras indican diferencias en el tiempo. # indica una tendencia para ser haber diferencias entre los grupos P=0,09.

Tabla 3. Efectos de la caída de progesterona sobre la frecuencia respiratoria (movimientos/min) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media ± SEM). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Frecuencia respiratoria	C1	P1	P
FR máxima	56,2 ± 6,4	56,4 ± 7,8	ns
Tiempo para llegar a FR máxima (min)	35,0 ± 6,6	1,0 ± 1,0	P<0,0001
Variación de FR OFT	6,0 ± 1,4	14,4 ± 5,3	ns

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; OFT: Open Field Test; ns: diferencia no significativa.

6.1.4- Temperatura superficial y rectal

Hubo un efecto del tiempo (P<0,01) para las temperaturas superficiales de la zona cardíaca y perineal y para la temperatura rectal, no siendo así para la temperatura superficial del abdomen izquierdo (Tabla 4). No hubo efectos de grupo ni interacción

para ninguna temperatura. Las temperaturas son presentadas en la Figura 4. Los parámetros analizados de las temperaturas son presentadas en la Tabla 5.

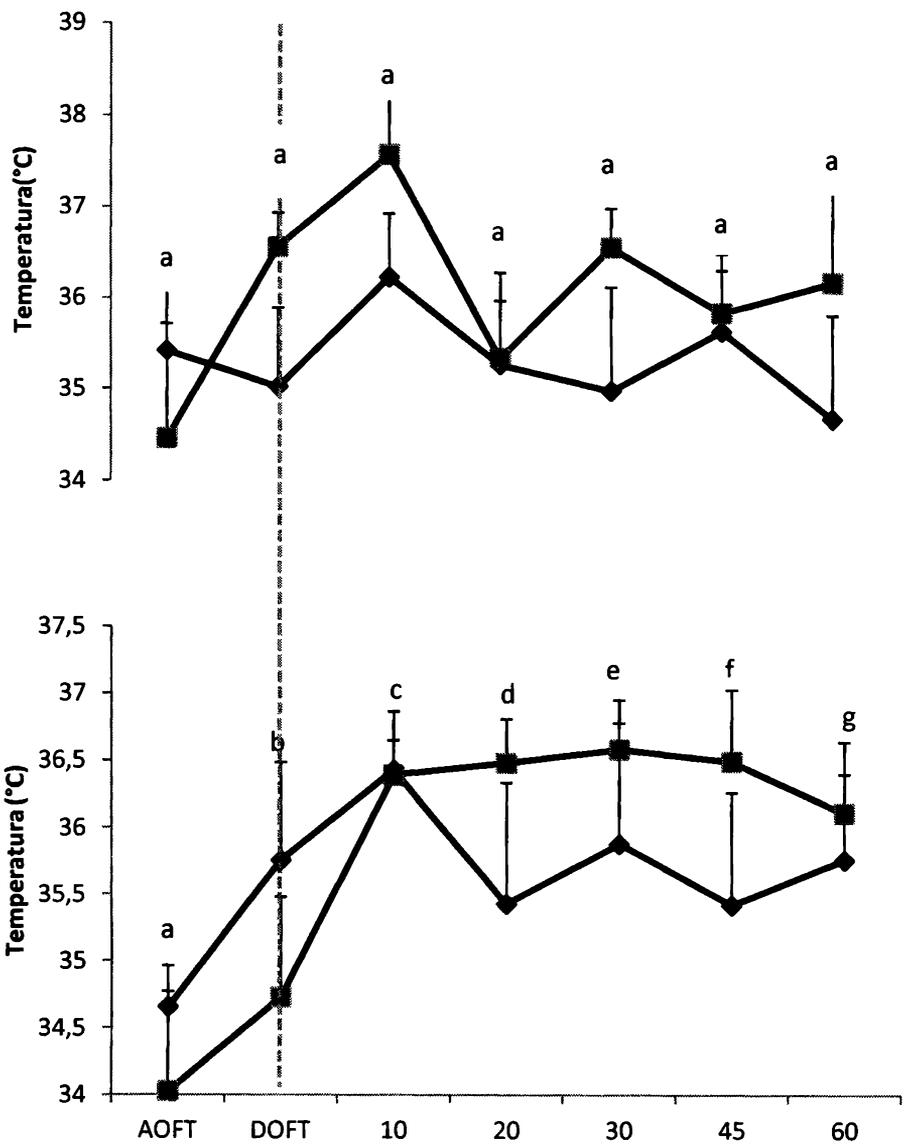
El grupo C1 presentó la temperatura superficial máxima en el abdomen izquierdo mayor que el grupo P1 ($P=0,02$), además alcanzó la temperatura rectal máxima antes que el grupo tratamiento ($P=0,02$).

Tabla 4. Efectos de la caída de progesterona sobre la temperatura superficial y rectal ($^{\circ}\text{C}$) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm SEM). Se muestra el efecto del tiempo sobre los diferentes registros. Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

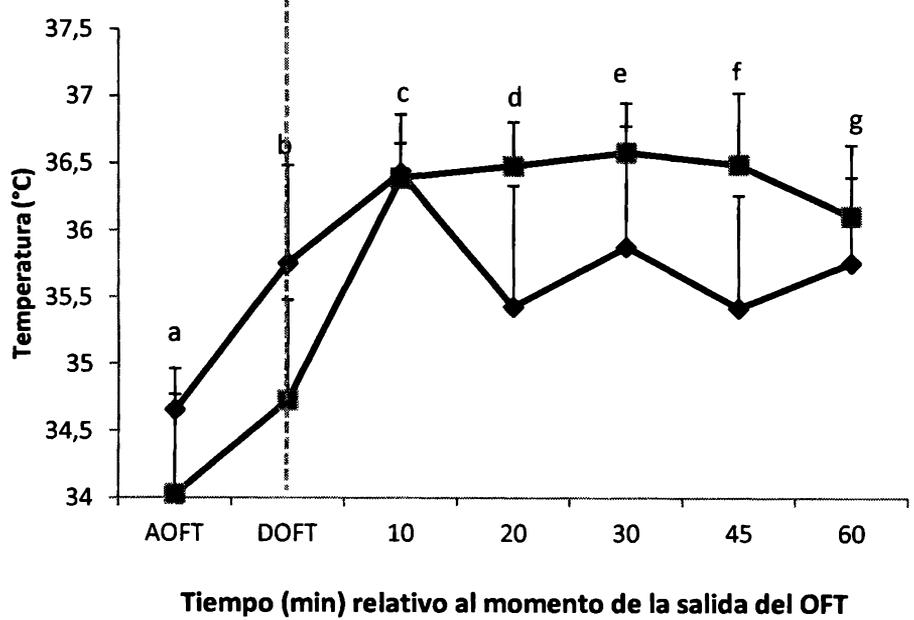
Variables	C1	P1	Tiempo
TS Cardíaca ($^{\circ}\text{C}$)	34,6 \pm 0,4	34,1 \pm 0,4	0,01
TS Abdominal ($^{\circ}\text{C}$)	36,1 \pm 0,5	35,3 \pm 0,5	ns
TS Perineal ($^{\circ}\text{C}$)	35,8 \pm 0,4	35,6 \pm 0,4	0,0009
T Rectal ($^{\circ}\text{C}$)	39,8 \pm 0,1	39,6 \pm 0,1	<0,0001

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; TS: temperatura superficial; T: temperatura; ns: diferencia no significativa.

a)



b)



Tiempo (min) relativo al momento de la salida del OFT

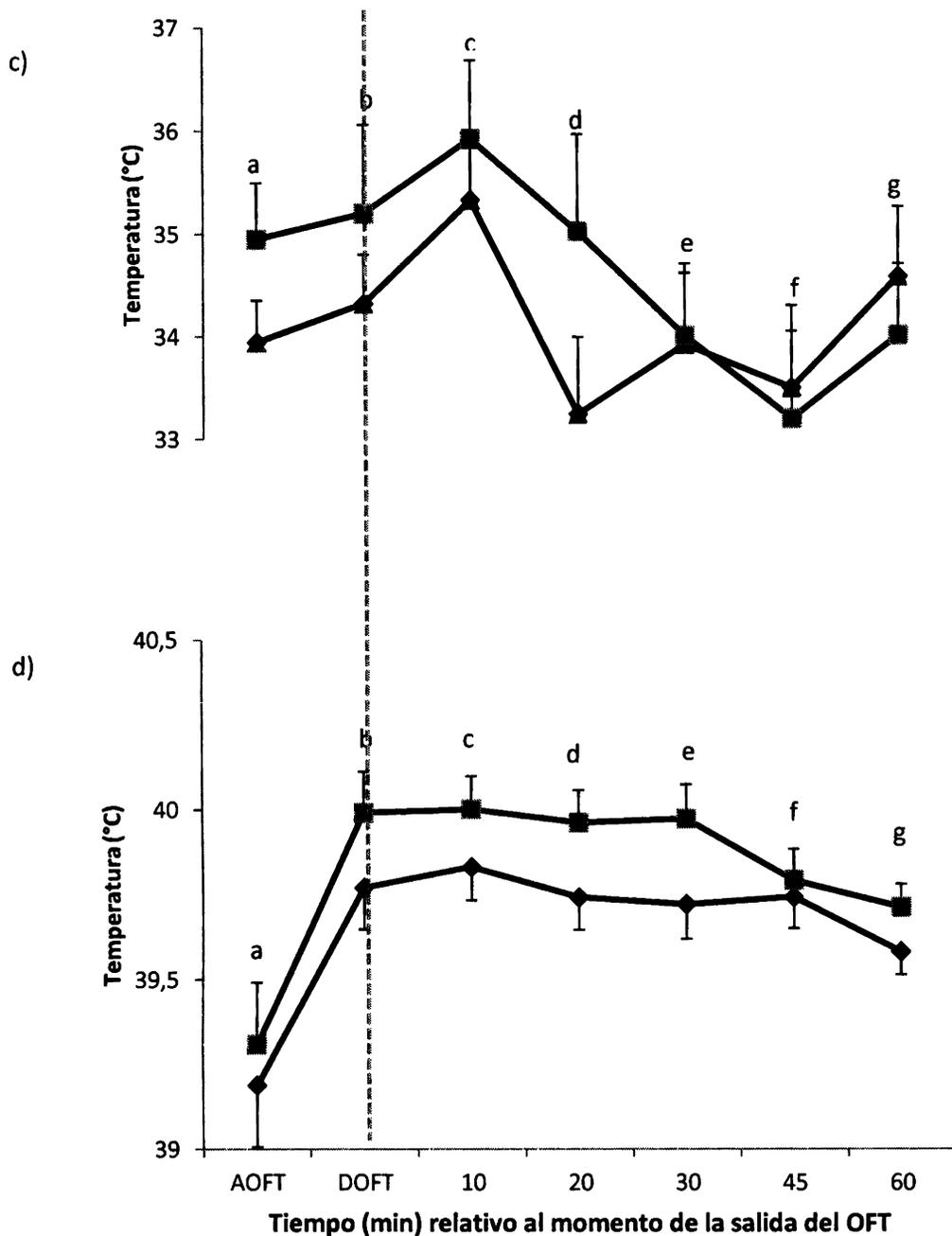


Figura 4. (a) Temperatura superficial del abdomen izquierdo, (b) temperatura superficial del perineo (c) temperatura superficial de la zona cardíaca, (d) temperatura rectal. Los símbolos corresponden a: Δ grupo tratamiento; \blacksquare grupo control. Las ovejas del grupo control no recibieron ningún tratamiento; las ovejas de grupo tratamiento utilizaron un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test. La línea punteada representa el tiempo de salida del Open Field Test. AOFT: tiempo antes de entrar al test; DOFT: tiempo de salida del test. Diferentes letras indican diferencias en el tiempo.

Tabla 5. Efectos de la caída de progesterona sobre la temperatura superficial y rectal (°C) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm SEM). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Variable	C1	P1	P
Temperatura rectal			
T. máxima (°C)	40,1 \pm 0,1	40,0 \pm 0,1	ns
Tiempo T. máxima (min)	6,0 \pm 2,7	22,5 \pm 5,7	0,017
Variación T OFT	0,68 \pm 0,07	0,58 \pm 0,07	ns
Temperatura cardiaca			
T. máxima (°C)	37,0 \pm 0,3	36,0 \pm 0,5	ns
Tiempo T. máxima (min)	10,5 \pm 4,6	13,0 \pm 7,0	ns
Variación T OFT	0,25 \pm 1,2	0,37 \pm 0,64	ns
Temperatura abdomen			
T. máxima (°C)	38,8 \pm 0,3	37,9 \pm 0,3	0,02
Tiempo T. máxima (min)	13,5 \pm 6,0	22,0 \pm 7,1	ns
Variación T OFT	2,1 \pm 1,1	-0,4 \pm 1,1	ns
Temperatura perineo			
T. máxima (°C)	37,7 \pm 0,3 \pm	37,2 \pm 0,9	ns
Tiempo T. max (min)	26,0 \pm 6,9	33,0 \pm 6,3	ns
Variación T OFT	1,1 \pm 0,8	0,7 \pm 0,8	ns

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; ns: diferencia no significativa; T: temperatura; OFT: Open Field Test.

6.1.5- Cortisol

La concentración de cortisol varió en función del tiempo ($P < 0,0001$), pero no hubieron efectos de grupo ni interacción grupo x tiempo (Figura 5). Las concentraciones máximas de cortisol tendieron a ser mayores en las borregas P1 que en las C1 ($P = 0,059$; Tabla 6). La variación de concentración durante el OFT (diferencia entre concentración de cortisol después y antes del OFT) también tendió a ser mayor en P1 ($P = 0,088$; Tabla 6).

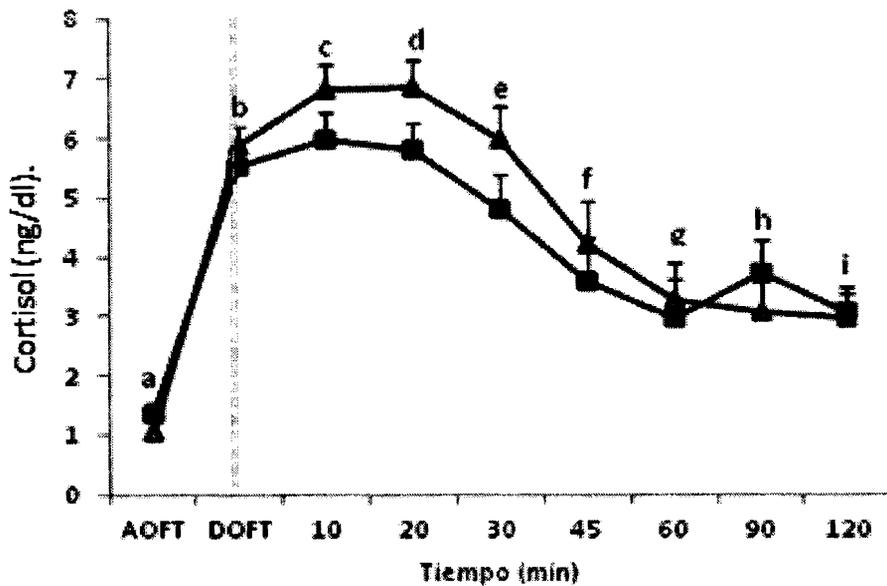


Figura 5. Efectos de la caída de progesterona sobre concentración sérica de cortisol. Los símbolos corresponden a: Δ grupo tratamiento; \blacksquare grupo control. Las borregas de grupo tratamiento utilizaron un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test. La línea punteada representa el tiempo de salida del Open Field Test. AOFT: tiempo antes de entrar al test; DOFT: tiempo de salida del test. Diferentes letras indican diferencias a lo largo del tiempo.

Tabla 6. Efectos de la caída de progesterona sobre la concentración de cortisol (nmol/L) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm sem). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Variable	C1	P1	P
Concentraciones de Cortisol			
Concentración máxima (nmol/L)	6,5 \pm 0,48	7,6 \pm 0,5	0,059
Tiempo a la concentración máxima (min)	18 \pm 8,7	16 \pm 2,7	ns
Variación de la concentración de cortisol al			
OFT	4,9 \pm 0,3	4,17 \pm 0,5	0,088

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; ns: diferencia no significativa; OFT: Open Field Test.

6.1.6- Glucemia

La glucemia varió con el tiempo ($P < 0,0001$), pero no hubo efectos de grupo ni interacción grupo x tiempo (Figura 6). C1 presentó su valor de glucemia más bajo menor que P1 ($P = 0,04$). La glucemia antes del OFT fue más alta en las borregas P1 que en las C1 ($P = 0,03$). Al final del muestreo la glucemia de P1 tendió a ser más alta que de C1 ($P = 0,1$). Todos los parámetros se presentan en la Tabla 7.

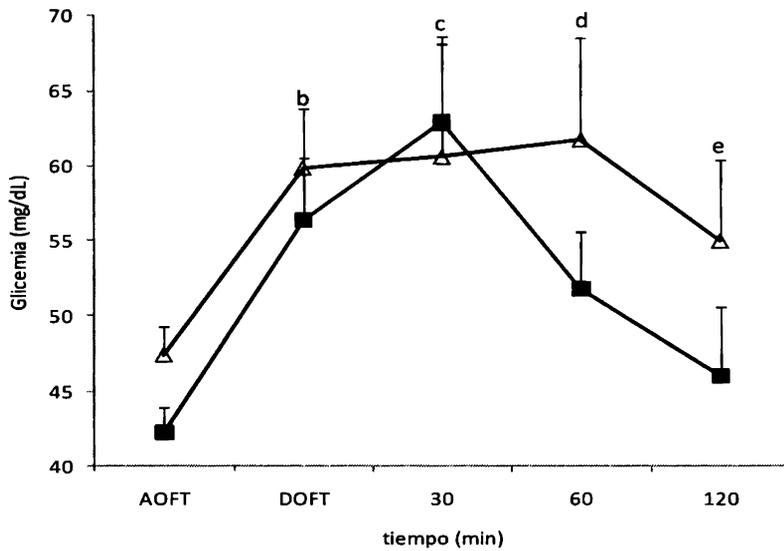


Figura 6. Efectos de la caída de progesterona sobre la glucemia. Los símbolos corresponden a: Δ grupo tratamiento; \blacksquare grupo control. Las borregas de grupo tratamiento utilizaron un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test. La línea punteada representa el tiempo de salida del Open Field Test. AOFT: tiempo antes de entrar al test; DOFT: tiempo de salida del test. Diferentes letras indican diferencias a lo largo del tiempo.

Tabla 7. Efectos de la caída de progesterona sobre la glucemia (mg/dL) de borregas durante un test de aislamiento social (OFT) (media \pm SEM). Las borregas C1 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P1 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 13 días, que fue retirado 24 h antes del test.

Variable	C1	P1	P
Glucemia			
Concentración máxima (mg/dL)	64,3 \pm 1,6	69,6 \pm 1,8	ns
Concentración mínima (mg/dL)	39,3 \pm 0,5	44,3 \pm 0,7	0,04
Tiempo a la concentración máxima (min)	36,0 \pm 3,1	30,5 \pm 2,4	ns
Variación de glucemia	12,4 \pm 1,1	14,1 \pm 1,1	ns
Final del muestreo (mg/dL)	46,0 \pm 0,6	55,0 \pm 1,7	0,1

C1: grupo control; P1: grupo tratamiento; ns: diferencia no significativa; OFT: Open Field Test.

6.2- Experimento 2: Comportamiento espontáneo

Antes del tratamiento con CIDR, los grupos P2 y C2 no presentaron diferencias en ninguno de los comportamientos ($P > 0,1$). A lo largo del tratamiento, para todas las frecuencias comportamentales hubo efectos del tiempo ($P < 0,0008$). Las borregas del grupo P2 caminaron más que las del grupo C2 ($P = 0,04$) y hubo interacción (tratamiento vs tiempo) para los comportamientos, parada, caminando y pastando ($P < 0,04$). En la tabla 8 se presentan los efectos registrados para cada comportamiento a lo largo del experimento. La cantidad de veces que las borregas defecaron, orinaron, y tomaron agua no fue estadísticamente diferente.

Tabla 8. Efectos de la caída de progesterona sobre las frecuencias (%) de los patrones comportamentales de borregas. Las borregas C2 no recibieron ningún tratamiento; las borregas P2 fueron tratadas con un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 12 días, que fue retirado 15 h antes de los registros comportamentales de la etapa sin CIDR.

Comportamientos	C2	P2	Grupo	Efectos	
				Tiempo	Interacción
Parada	57,3 ± 1,9	53,9 ± 1,9	ns	< 0,0001	0,03
Echada	36,4 ± 1,9	38,0 ± 1,9	ns	< 0,0001	ns
Caminando	6,3 ± 0,6	8,1 ± 0,6	0,04	0,0008	0,03
Pastando	53,0 ± 1,8	53,1 ± 1,8	ns	< 0,0001	0,04
Rumiando	4,9 ± 0,7	5,2 ± 0,7	ns	< 0,0001	ns

C2: grupo control; P2: grupo tratamiento; ns: diferencia no significativa. Las frecuencias de los diferentes comportamientos a lo largo del tratamiento están descritas en la Figura 7.

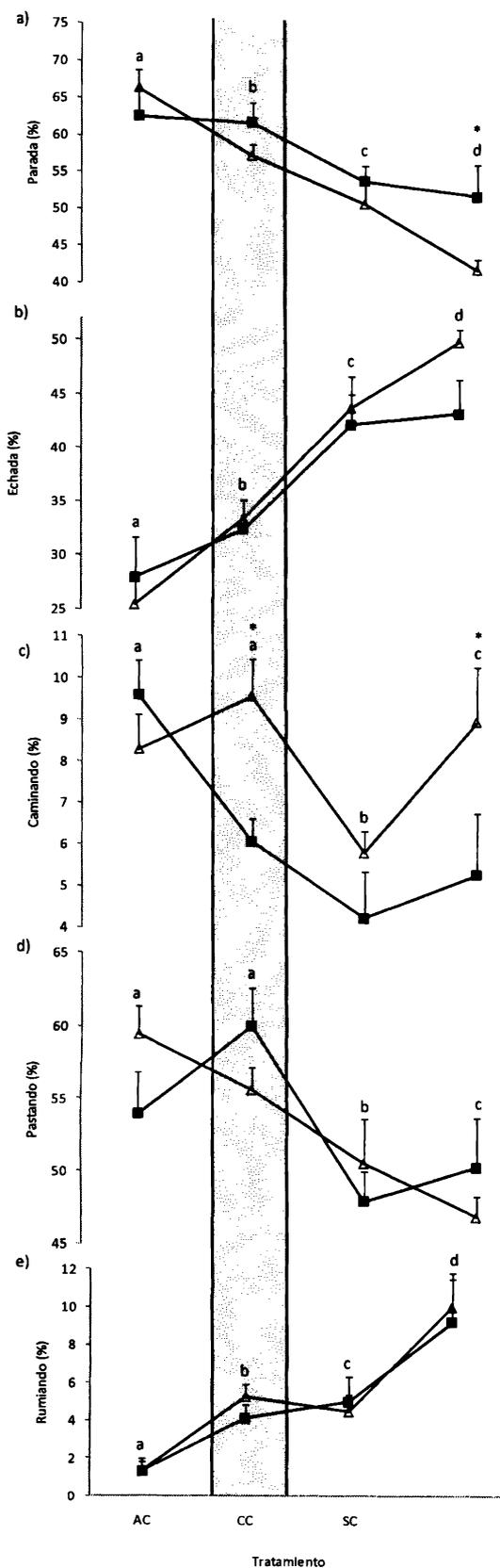


Figura 7. (a) Frecuencia (%) del comportamiento parada, (b) frecuencia (%) del comportamiento echada, (c) frecuencia (%) del comportamiento caminando, (d) frecuencia (%) del comportamiento pastoreando, (e) frecuencia (%) del comportamiento rumiando. Los símbolos corresponden a: Δ grupo tratamiento P2; \blacksquare grupo control C2. Las ovejas del grupo C2 no recibieron ningún tratamiento; las ovejas de grupo P2 utilizaron un CIDR conteniendo 0,3 g de progesterona durante 12 días, que fue retirado 15 h antes de los registros comportamentales de la etapa sin CIDR. La franja representa la media de los 3 últimos días en que las ovejas P2 tuvieron el CIDR. AC: antes de poner los CIDR; CC: con CIDR; SC: sin CIDR. Diferentes letras indican diferencias en el tiempo. * indica diferencias entre los grupos $< 0,05$.

7- Discusión

En el presente trabajo se generó información que soporta la hipótesis inicial, dado que la caída de la P4 generó ansiedad y mayor sensibilidad al estrés de aislamiento social. Esto se reflejó en que las ovejas del grupo P1 sometidas al OFT presentaron respuestas de cortisol, glucemia y FR mayores, y en las ovejas del grupo P2 la ansiedad se reflejó principalmente en el cambio de la frecuencia del comportamiento caminando.

Más aún, dado que no existen trabajos anteriores en que se estudiara el efecto de la disminución de P4 en ovinos, no es claro si el trabajo se hizo en el momento en que se lograra la máxima respuesta, por lo que podría esperarse que las diferencias puedan ser aún mayores. Debido a esta falta de antecedentes fue que nos concentramos en comparar las diferencias generadas entre los grupos tratamiento y control, así como también analizar la alteración en los parámetros estudiados partiendo de valores basales. En la siguiente tabla se representan los valores de los parámetros analizados que fueron tomados como valores basales.

PARAMETRO	VALORES BASALES	UNIDADES
Frecuencia Cardíaca	70/90	Latidos/minuto
Frecuencia Respiratoria	20/30	Movimientos/minuto
Temperatura	38,5-40	°C
Glucemia	55-95	mg/dl
Cortisol sanguíneo	1,2-3,1	ng/dl

(Ramos y Ferrer, 2007).

Las elevadas concentraciones séricas de glucosa en los animales del grupo P1 con respecto al grupo C1 previas al OFT, sugieren que los animales del primer grupo presentaban cierto grado de estrés incluso antes de la realización de la prueba. Esto podría adjudicarse al tratamiento ya que todas las ovejas provenían del mismo ambiente y se manejaron de igual manera. El cortisol y la glucemia permanecieron altos luego del OFT, hasta el final del muestreo, lo que indica que la situación luego del OFT seguía siendo estresante (continuar con la manipulación, sangrados y encierro).

El grupo P1 presentó mayores valores de FR, y C1 los máximos de temperatura rectal antes que P1, y presentó mayores valores de temperatura abdominal, lo que podría ser explicado porque parte del calor del organismo se pierde por la vía respiratoria (Bengt y Hallgrimur, 1999). El aumento de la FR influye sobre la disminución de la temperatura rectal y superficial del abdomen, dado por un fenómeno de termorregulación, lo que podría explicar los resultados encontrados de temperaturas rectal y superficial del abdomen del grupo P1.

En cuanto a la frecuencia cardíaca, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, pero lo que si se evidenció es que todos los animales tuvieron antes del

OFT frecuencias cardíacas elevadas. La frecuencia cardíaca puede estar alterada por varios factores entre ellos el esfuerzo físico, el miedo y la estimulación simpática (Ramos y Ferrer, 2007). Esto nos podría estar indicando que los animales ya presentaban cierto estrés antes del ingreso al OFT lo que podría deberse principalmente a que los animales no parecían estar acostumbrados al manejo con gente.

La falta de diferencia en los comportamientos podría deberse al hecho de que considerando los valores registrados, la respuesta parecería estar maximizada y esto podría enmascarar diferencias entre los grupos. El número de inmobilizaciones que se obtuvieron en ambos grupos durante el OFT fue mayor en comparación a otro trabajo donde también se sometieron ovinos a un OFT durante 10 minutos (Damián, 2011).

Los comportamientos espontáneos que demuestran ansiedad se manifestaron principalmente en la tarde posterior a la retirada del CIDR (12 a 24 h después), tiempo durante el cual la P4 alcanza niveles basales. Hubieron mayores frecuencias en los comportamientos de caminando y menores frecuencias para parada en el grupo tratamiento, que como se citó anteriormente, podrían de alguna manera incidir en el aumento de ansiedad debido a la caída de P4.

8- Conclusiones

En síntesis, la respuesta al test de aislamiento social fue mayor luego de la caída de P4, lo que podría demostrar una mayor respuesta de estrés. Además, la disminución brusca de P4 generó cambios en los comportamientos espontáneos que podrían reflejar una mayor ansiedad.

9- Bibliografía

1. Apple JK, Dikeman ME, Minton JE, McMurphy RM, Fedde MR, Leith DE, Unruh JA (1995). Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. *Journal of Animal Science* 73:2295-2307.
2. Apple JK, Minton JE, Parsons KM, Unruh JA (1993). Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *Journal of Animal Science* 71:71-77.
3. Andr en L, Nyberg S, Turkmen S, Wingen GV, Fern andez G, B ackstr om T (2009). Sex steroid induced negative mood may be explained by the paradoxical effect mediated by GABA-a modulators. *Psychoneuroendocrinology* 34:1121-1132.
4. Barbaccia ML, Concas A, Serra M, Biggio G (1998). Stress and Neurosteroids in adult and aged rats. *Experimental Gerontology* 33:697-712.
5. Bengt EA, Hallgrimur J (1999). Regulaci n de la temperatura y fisiolog a ambiental. En: Swenson MJ, Reece WO. *Fisiolog a de animales dom sticos de Dukes*. 5a ed. M jico, Limusa. p. 886-895.
6. Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991). Anxiolytic effects of 3a-hydroxy-5a-pregnenolone: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA-a receptor. *Brain Research* 561:157-161.
7. Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK (1993). Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in Cortical Allopregnalone and GABA-a receptor function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 45:423-428.
8. Bouissou MF, Porter RH, Boyle L, Ferreira G (1996). Influence of a conspecific image of own vs. different breed on fear reactions of ewes. *Behavioural Processes* 38:37-44.
9. Bouissou MF, Vandenheede M (1995). Fear reactions of domestic sheep confronted with either a human or a human-like model. *Behavioural Processes* 34:81-92.
10. Broom DM (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal* 142:524-526.
11. Broom DM, Kirkden RD (2004). Bienestar, estr s, comportamiento y fisiopatolog a. En: Dunlop RH, Malbert CH. *Fisiopatolog a veterinaria*. Zaragoza, ACRIBIA. p. 359-392.
12. Burdick NC, Carroll JA, Hulbert LE, Dailey JW, Willard ST, Vann RC, Welsh TH Jr, 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.

13. **Damián JP (2011). Estrés y jerarquía social en carneros: respuestas bioquímicas, fisiológicas y comportamentales a diferentes estresores. Tesis de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 116 p.**
14. **Camacho I, Pasapera AM, Pérez G, Cerbón MA (1995). Progesterone and its metabolites the functions of the central nervous system. Revista de Investigación Clínica 47(4):329-340.**
15. **Carlson NR (1998). Fisiología de la conducta. 3a ed. Barcelona, Ariel. p. 836.**
16. **Crossley KJ, David IN, Walker W, Lawrence AJ, Beart PM, Hirst JJ (2003). Steroid-sensitive GABA-a receptors in the fetal sheep brain. Neuropharmacology 45:461-472.**
17. **Crossley KJ, Walker DW, Beart PM, Hirst JJ (2000). Characterisation of GABA-a receptors in fetal, neonatal and adult ovine brain: region and age related changes and the effects of allopregnanolone. Neuropharmacology 39:1514-1522.**
18. **Ferreira A, Carrau A, Rodas E, Rubianes E, Benech A (1992). Diazepam facilitates acceptance of alien lambs by postparturient ewes. Physiology and Behavior 5:1117-1121.**
19. **Fraille IG, Mc Ewen BS, Pfaff DW (1986). Progesterone inhibition of aggressive behaviors in hamsters. Physiology and Behaviour 39:225-229.**
20. **Forkman B, Boissy A, Meunier-Salaün MC, Canali E, Jones RB (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. Physiology and Behaviour 92:340-374.**
21. **Frye CA, Hirst JJ, Brunton PJ, Russell JA (2011). Neurosteroids for a successful pregnancy. Journal on the Biology of Stress 14(1):1-5.**
22. **Gallo MA, Smith SS (1993). Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: A possible rat model of PMS anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior 46:897-904.**
23. **Gómez B, Escobar A (2006). Estrés y sistema inmune. Revista Mexicana de Neurociencia 7(1):30-38.**
24. **Goodman RL, Inskeep EK (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3a ed. Missouri, Elsevier. p. 2389-3447.**
25. **Hawkinson JE, Kimbrough CL, McCauley LD, Bolger MB, Lan NC, Gee KW (1994). The neuroactive steroid 3a-hydroxy-5a-pregnenolone is a two-component modulator of ligand binding to the GABA-a receptor. European Journal of Pharmacology Molecular Pharmacology Section 2 269:157-163.**

26. Heinsbroek R, Van Haaren F, Van de Poll NE (1988). Effects of progesterone on Open Field behavior of food deprived ovariectomized female rats. *Physiology and Behaviour* 43:779-782.
27. Kunert MP (2007). Estrés y adaptación. En: Porth CM. *Fisiopatología Salud enfermedad: un enfoque conceptual*. 7a ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, p.187-200.
28. Landgren SOE (1991). Pregnanolone (3 α -hydroxy-5 α -pregnenolone) a progesterone metabolite, facilitates inhibition of synaptic transmission in the Schäffer collateral pathway of the guinea pig hippocampus in vitro. *Epilepsy Reserch* 10:156-165.
29. Lynch JJ, Hinch GN, Adams DB (1992). *The behaviour of sheep: Biological principles and implications for production*. Madison, CAB International. 237p.
30. Löfgren M, Inga-Maj J, Bengt M, Per L, Torbjörn B (2006). Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Hormones and Behavior*; 50: 208-215.
31. Löfgren M, Johansson I, Meyerson B, Turkmen S, Bäckström T (2009). Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. *Physiology and Behavior*; 96: 91-97.
32. Moberg GP (2000). Biological Response to Stress: Implications for animal welfare. En: Moberg, G.P, Mench, J.A. *The Biology of Animal Stress*. Wellingford, CABI. p.1-22.
33. Moberg GP, Anderson O, Underwood TR (1980). Ontogeny of the adrenal and behavioral responses of lambs to emotional stress. *Journal of Animal Science* 51:138-142.
34. Mok WM, Bukusoglu C, Krieger NR (1993). 3 -hydroxy-5 α -pregnan-20-one is the only active anesthetic steroid in anesthetized mouse brain. *Steroids* 58:112-114.
35. Mostl E, Palme R (2002). Hormone as indicator of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23:67-74.
36. Nelson JR (2000). Stress. En: Nelson JR. *An introduction to behavioral endocrinology*. 2a ed. Massachusetts, Sinauer. p. 557-591.
37. Nelson DL, Cox MM (2009). Regulación hormonal e interpretación del metabolismo de los mamíferos. En: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica*. 5ª ed. Barcelona, Omega. p. 901-944.
38. Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW (2001). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. En: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. *Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics*. 8a ed. Londres, Elsevier. p. 1-53.

39. Pedernera-Romano C, Ruiz de la Torre JL, Badiella L, Manteca X (2010). Effect of perphenazine enanthate on open-field test behaviour and stress-induced hyperthermia in domestic sheep. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 3:329-332.
40. Ramos JJ, Ferrer LM (2007). La exploración clínica del ganado ovino y su entorno. Zaragoza, Servet. 422p.
41. Romeyer A, Bouissou M (1992). Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science* 34:93-119.
42. Rushen J (2000). Some issues in the interpretation of behavioural responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress*. Wellingford, CABI. p. 23-42.
43. Sapolsky RM (2002). Endocrinology of stress-response. En: Becker JB, Breedlove SM, Crews D, McCarthy MM. *Behavior endocrinology*. 2a ed. Cambridge, MIT. p. 409-450.
44. Squires EJ (2003). *Applied Animal Endocrinology*. Wallingford, CABI. 234p.
45. Stabenfeldt GH, Edquist LE (1999). Proceso de la reproducción de la hembra. En: Swenson MJ, Reece WO. *Fisiología de animales domésticos de Dukes*. 5a ed. Méjico, Limusa. p. 678-710.
46. Starkey NJ, Bridges NJ (2010). The effects of acute, chronic and withdrawn progesterone in male and female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) in two tests of anxiety. *Behavioural Brain Research* 207:490-499.
47. Ungerfeld R (2002). Control endócrino del ciclo estral. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea. p. 41-55.
48. Viérin M, Bouissou MF (2001). Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiology and Behavior* 72:579-587.
49. 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.
50. Vincens LM, Shu C, Moguilewsky M, Philibert D (1989). A progesterone metabolite enhances the activity of the GABA-a receptor complex at the pituitary level. *European Journal of Pharmacology* 168:15-21.
51. 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* 33:127-141.
52. Wieland S, Lan NC, Mirasedeghi S, Gee KW (1991). Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5a-pregnan-3a-ol-20 one. *Brain Reserch* 565:263-268.