

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ETAPA DEL CICLO ESTRAL Y RESPUESTA DE ESTRÉS AL AISLAMIENTO SOCIAL EN
OVEJAS**

por

**ALZUGARAY PERDOMO, Irene María
SANCHEZ BARBEROUSSE, María Pía**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias (Orientación Producción
Animal, Bloque Rumiantes)**

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
Livia Pinto Santini

Segundo miembro (Tutor): _____
Dra. Aline Freitas de Melo

Tercer miembro: _____
Carolina Fiol

Cuarto miembro: _____
Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha: 24/08/2020

Autores: _____

Br. Irene María Alzugaray

Br. María Pía Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a Aline Freitas de Melo y a Rodolfo Ungerfeld por su dedicación y por el apoyo brindado dado que fueron muy importantes durante la realización de este trabajo. También agradecer a Fernando Perdigón, el cual nos permitió utilizar las instalaciones del Campo Experimental de Migués.

A Mariana Kako, Camila Crosa y Belén López por ayudarnos en la parte práctica de este proyecto.

A la Facultad de Veterinaria y a los profesores de esta institución por nuestra formación como profesionales.

Por último, agradecer especialmente a nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	10
2.1Ciclo estral.....	10
2.2 Estrés	11
2.3 Situaciones estresantes.....	12
2.4 Respuesta aguda de estrés.....	13
2.5 Respuesta crónica de estrés	14
2.6 Indicadores de estrés	14
2.7 Factores que influyen en la respuesta de estrés	15
2.8 Influencia de los estrógenos, de la progesterona y de la etapa del ciclo estral sobre la respuesta de estrés	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS.....	18
5. MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1 Local de estudio, animales y manejo.....	19
5.2Test de aislamiento social	19
5.3Frecuencia cardíaca y respiratoria y temperatura corporal	19
5.4Obtención de muestras de sangre.....	20
5.5 Medición de cortisol y progesterona	20
5.6 Medición de proteínas totales, albúmina y glucemia	20
5.7 Análisis estadísticos	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Parámetros comportamentales	22
6.2 Parámetros fisiológicos	22
6.2.1 Frecuencia cardíaca y respiratoria	22
6.2.2 Temperaturas superficial y rectal.....	23
6.3 Parámetros bioquímicos	25
Proteínas séricas.....	25
6.4 Cortisol y glicemia.....	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	30
9. BIBLIOGRAFIA.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del ciclo estral de ovejas y las variaciones de las principales hormonas a lo largo del ciclo.	11
Figura 2. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal con la subsiguiente liberación de cortisol desde la corteza adrenal durante la respuesta de estrés.	13
Figura 3. Frecuencia cardíaca y respiratoria en ovejas en fase folicular y en fase luteal, desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social hasta 20 minutos después de salir del mismo.	23
Figura 4 Variación de la temperatura de la región abdominal, zona cardíaca y rectal en ovejas en fase folicular y en fase luteal, desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social hasta 20 minutos después de salir de la misma.	24
Figura 5. Las concentraciones de proteínas totales, globulinas y albúmina desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social hasta 120 minutos después de salir de la misma en ovejas en fase folicular y en fase luteal.	26
Figura 6. Concentraciones de cortisol en ovejas en fase folicular y en fase luteal, desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social hasta 120 minutos después de salir del mismo.	27
Figura 7. Variación de la glicemia en ovejas en fase folicular y en fase luteal, desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social hasta 20 minutos después de salir de la misma.	27
Tabla 1 Efecto del test de aislamiento social sobre el comportamiento de ovejas en celo y en fase luteal	22

RESUMEN

El ovino es una especie gregaria, por lo que cualquier manejo que implique aislamiento del grupo social produce una respuesta de estrés. En la hembra mamífera, el tratamiento con progesterona, la gestación y la etapa del ciclo estral modifica la sensibilidad a estresores. El objetivo de esta Tesis fue comparar las respuestas comportamentales y fisiológicas en ovejas en fase folicular y en fase luteal sometidas al test de aislamiento social (TAS). Se utilizaron 20 ovejas Corriedale, las que fueron previamente sincronizadas con prostaglandina ($\text{PGF2}\alpha$), permitiendo que el TAS se realizara en ovejas en fase folicular ($n=10$) y en fase luteal ($n=10$) simultáneamente. El TAS consistió en el aislamiento individual por 10 min, en un corral de 4 m x 4 m, con el piso dividido en 16 cuadrantes y con paredes blancas, impidiendo el contacto físico y visual con el resto de la majada. Una vez concluido el TAS, las ovejas fueron integradas a un corral en el que había más animales de su grupo social. El TAS se realizó durante 3 días consecutivos y las actividades de los animales fueron registradas por medio de dos cámaras de video localizadas en diferentes ángulos del corral de prueba. Durante la prueba, se determinó la cantidad de olfateos, inmobilizaciones, intentos de escape, líneas divisorias cruzadas, vocalizaciones, eliminaciones (orina + heces), y el tiempo de permanencia en los cuadrantes de la periferia. Se midió la temperatura rectal y superficial (zona cardíaca, región abdominal y región del periné), la frecuencia cardíaca y respiratoria, y la concentración de cortisol, proteínas totales, albúmina y globulinas séricas antes y después del TAS. Las ovejas en fase folicular tendieron a vocalizar e inmobilizarse más veces que las ovejas en fase luteal (número de vocalizaciones: $7,0 \pm 2,5$ vs $1,1 \pm 2,3$; $P=0,1$ y número de inmobilizaciones: $9,9 \pm 2,1$ vs $4,4 \pm 2,1$; $P=0,1$, respectivamente). Además, las ovejas en fase folicular tuvieron mayor concentración de proteínas totales ($7,0 \pm 0,1$ g/dL vs $6,7 \pm 0,1$ g/dL; $P=0,04$) y globulinas ($2,7 \pm 0,1$ g/dL vs $2,4 \pm 0,1$ g/dL; $P=0,02$, respectivamente) que las ovejas en fase luteal. La temperatura superficial del área abdominal fue mayor en ovejas en fase folicular que en las ovejas en fase luteal ($36,3^\circ\text{C} \pm 0,4$ vs $35,2^\circ\text{C} \pm 0,7$; $P=0,05$ respectivamente). Las otras variables no difirieron según la etapa del ciclo estral. En conclusión, las ovejas en fase folicular parecerían ser más sensibles al aislamiento social que las ovejas en fase luteal.

SUMMARY

Sheep are gregarious animals, thus, individual isolation from the flock provokes stress response. In ruminants, treatments with progesterone, gestation and the stage of estrous cycle modify the sensitivity to stressors. The aim of the present study was to compare the behavioral and physiological responses in oestrus and dioestrous ewes submitted to Open Field Test (OFT). The estrous cycle was synchronized with PGF2 α , and thus, at the time of the test there were ewes in oestrus (n=7) and dioestrous (n=8) simultaneously. Ewes were individually isolated for 10 minutes in a 4 m x 4 m pen with the floor marked with 16 squares and white walls, avoiding physical or visual contact with the rest of the social group. The OFT was done in 3 consecutive days and all the ewes' behaviors were video recorded with two cameras. The number of sniffs, freezing, escape attempts, lines crossed, vocalization, elimination (urinations + defecations) and the time that each ewe remained on peripheral squares were determined during the test. Serum total protein, albumin, globulin and cortisol concentrations were determined before and after the tests as well as rectal and surface temperature (cardiac, abdominal and perineal areas), heart and respiratory rates. Once we finished the test, ewes were left in a corral with the rest of the flock. The ewes in follicular phase tended to vocalize and freeze more times during social isolation than dioestrous ewes (7.0 ± 2.5 vs 1.1 ± 2.3 ; $P=0.1$ and 9.9 ± 2.1 vs 4.4 ± 2.1 ; $p=0.1$, respectively). Follicular phase ewes had greater concentrations of total protein (7.0 ± 0.08 g/dL vs 6.7 ± 0.09 g/dL; $P=0.04$) and globulins (2.7 ± 0.1 g/dL vs 2.4 ± 0.1 g/dL; $P=0.02$ respectively). Surface temperature on the abdominal area tended to be greater in follicular phase ewes than in dioestrous ewes (36.3 ± 0.4 °C vs 35.2 °C ± 0.7 ; $P= 0.05$, respectively). The other variables did not differ according oestrous-cycle stages. In conclusion, follicular phase ewes seem to be more sensitive to social isolation than dioestrous ewes.

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, los ovinos tienen un manejo fundamentalmente extensivo con mínima intervención humana, por lo que varias prácticas realizadas en la producción ovina pueden ser especialmente estresantes para los animales. Estas prácticas pueden ser la señalada (Edwards y Johnston, 1999), la castración (Melches y col., 2007), el destete artificial (Orgeur y col., 1999), la esquila (Carcangiu y col., 2008), la vacunación, la mezcla de animales de diferentes grupos sociales y el transporte (Orihuela y col., 2002; Burdick y col., 2010). Además, algunos de estos manejos como la esquila, implican la contención y la separación del animal de su grupo social, lo que también genera una marcada respuesta de estrés (Carcangiu y col., 2008). Se han diseñado pruebas experimentales de aislamiento social para estudiar la respuesta de miedo en animales de producción, uno de ellos es el TAS. Los efectos a este desafío fueron evaluados primariamente en roedores (Hall, 1934), con posteriores estudios en rumiantes (Forkman, 2007; Hawken y col., 2012).

Los ovinos son una especie gregaria, por lo que son muy sensibles al estrés provocado por el aislamiento social, el que provoca un fuerte impacto emocional (Price y Thos, 1980; Pierzchala y col., 2010). Ante esto, se activan el sistema simpático y el sistema endócrino, teniendo este último una respuesta más lenta. En conjunto, la respuesta aguda de estrés genera cambios fisiológicos y comportamentales en el animal con el objetivo de adaptarse al estresor. Por ello, se pueden evaluar los cambios fisiológicos y comportamentales a partir de indicadores de estrés. El cortisol es uno de los indicadores utilizados por excelencia en rumiantes, y debido a sus efectos hiperglicemiantes, se puede medir, además, la glicemia (Cunningham y col., 2008). Dentro de los factores fisiológicos, la frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR), y la temperatura rectal y superficial son buenos indicadores para determinar la magnitud del estrés (Squires, 2003). También se pueden evaluar las conductas que indican miedo y estrés como son las vocalizaciones, micción, defecación (Romeyer y Bouissou, 1992), inmovilización, olfateos, lamidos y locomoción (Forkman, 2007).

A su vez, se ha reportado en roedores que el momento del ciclo estral puede afectar la respuesta de estrés (Komesaroff y col., 1998). En este sentido, se ha determinado que las diferentes concentraciones de progesterona (P4) y estrógenos (E2) modulan la intensidad de la respuesta de estrés (Baron y Brush, 1979). Esto se ha determinado en varios trabajos, tanto en borregas (Cassarino y Magri, 2012), ovejas (Viérin y Bouissou, 2001), terneras (Freitas-de-Melo y col., 2019), vacas (Thun y col., 1998) y mujeres (Lindheim y col., 1992). Los metabolitos de P4 se consideran neuroesteroides que actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, produciendo efectos ansiolíticos, sedativos y anestésicos (Hawkinson y col., 1994; Crosseley, 2000). Estos metabolitos neuroactivos de la P4 afectan la expresión génica y liberación de la hormona liberadora corticotropina (CRH) y por lo tanto la secreción de la hormona adenocorticotropa (ACTH) y de glucocorticoides (Patchev y col., 1994). Durante la gestación ocurre una disminución de la sensibilidad de los barrorreceptores, así como la disminución de la presión arterial debido a la acción de la P4 sobre GABA_A, pudiendo afectar la producción de ACTH (Heesch y Rogers, 1995). Por otra parte, los máximos niveles de E2 están asociados con altos niveles de cortisol (Lyimo y col., 2000). Los animales se vuelven más sensibles a factores estresantes cuando aumentan los niveles E2, sintetizando y liberando mayores cantidades de ACTH y cortisol (Burguess y Handa, 1992). De acuerdo con las diferencias antes mencionadas, se planteó estudiar si la etapa

del ciclo estral modifica la respuesta al estrés de aislamiento social en ovejas. Con esta información se podría generar una buena herramienta para mitigar los efectos adversos de diferentes manejos estresantes en animales de producción, promoviendo el bienestar de los mismos. Además, sería útil esta información para poder ser tomada en cuenta durante los protocolos de inseminación artificial debido a la mayor vulnerabilidad que presentarían las ovejas durante la fase folicular.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Ciclo estral

El ciclo estral es el período comprendido entre dos estros consecutivos (Senger, 2005), que en las ovejas tiene una duración promedio de 17 días (Jainudeen y col., 1985). La mayoría de las ovejas tienen un patrón reproductivo poliéstrico estacional de día corto, ciclando cuando disminuyen las horas de luz (Noakes y col., 2001; Rosa y Bryant, 2003). En Uruguay, normalmente la estación reproductiva de los ovinos es el verano-otoño, cuando presentan mayor fertilidad y fecundidad (Abella, 1996). Esto se debe a que la oscuridad estimula a la glándula pineal a secretar melatonina de forma circadiana, generando un efecto positivo cuando aumentan las horas de oscuridad en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo (Bittman y col., 1983; Goldman, 2001). La GnRH tiene un rol central en la actividad reproductiva, actuando sobre la hipófisis, estimulando la producción y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), hormonas que estimulan el crecimiento y desarrollo de los folículos (Moenter y col., 1990), y la ovulación. El ciclo estral puede ser dividido en dos fases: la fase folicular, comprendida por proestro y estro con una duración aproximada de 4 días, y la fase luteal, con una duración de 12-13 días, que incluye el metaestro y el diestro (Noakes y col., 2001; Ungerfeld, 2002; Senger, 2005). El estro, período de aceptación del macho por parte de la hembra (Senger, 2005), tiene una duración de 24-36 h (Jainudeen y col., 1985); la ovulación ocurre mayoritariamente al final del estro (Quirke y col., 1981). En el metaestro, las células del folículo preovulatorio dan lugar a la formación del cuerpo lúteo, y en diestro, el cuerpo lúteo está activo, produciendo y secretando niveles altos de P4 (valores que varían entre 3,2 y 11,4 nmol/L en ovejas) (Bartlewski y col., 1999; Noakes y col., 2001). Después de la ovulación, la P4 comienza a aumentar siendo máxima en los días 10 a 12 del ciclo estral, manteniéndose en forma de meseta hasta la luteólisis (Thorburn y col., 1969). Luego del diestro continúa el proestro, período durante el cual aumenta el crecimiento folicular y se produce la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior (Noakes y col., 2001). La figura 1 representa esquemáticamente las variaciones de las diferentes hormonas durante el ciclo estral en ovejas.

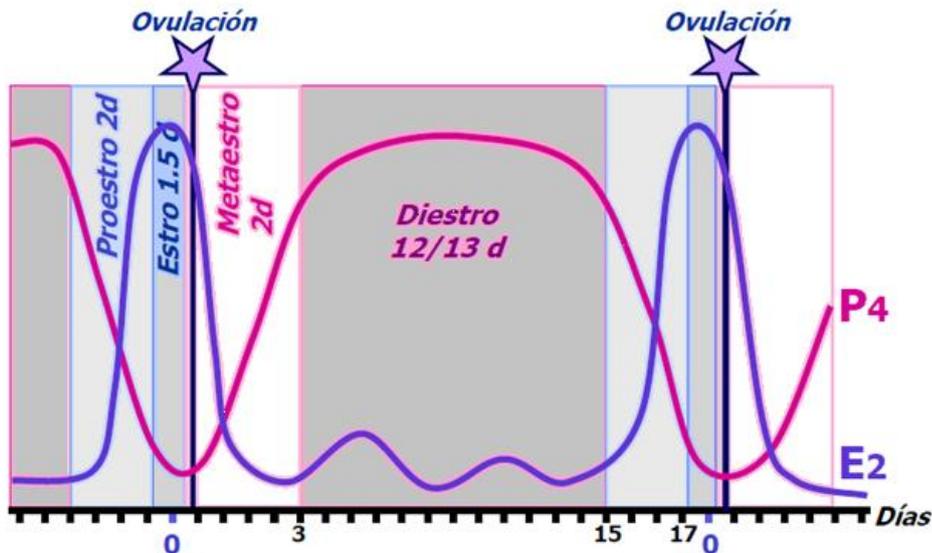


Figura 1. Representación esquemática del ciclo estral de ovejas y las variaciones de las principales hormonas a lo largo del ciclo (Senger, 1999).

Durante la fase folicular predominan los E2, estando el diámetro folicular relacionado positivamente con las concentraciones circulantes de los mismos (Fierro y col., 2016). Los E2 provocan una retroalimentación positiva o negativa en el control de la liberación de LH o FSH, a partir del eje hipotalámico-hipofisario según los niveles circulantes de P4. En la fase folicular, los E2 tienen un efecto de retroalimentación positiva, generando un aumento en la síntesis y secreción de LH, culminando con la ovulación (Noakes y col., 2001). Por el contrario, durante la fase luteal la retroalimentación es negativa (Senger, 2003). Previa a la ovulación, el folículo dominante ya comienza a luteinizarse para formar el cuerpo lúteo, por lo que durante la fase luteal predomina la P4 (Bartlewski y col., 1999; Senger, 2005). La finalización de la secreción de estradiol tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH y un nuevo reclutamiento de los folículos de la siguiente onda folicular (Bartlewski y col., 1999). Al final de la fase luteal, el útero libera PGF2- α , promoviendo la regresión del cuerpo lúteo, provocando una disminución en la concentración de P4 (McCracken y col., 1972; Hansel y col., 1973).

2.2 Estrés

El término estrés describe un estado de amenaza a la homeostasis o un desbalance de la misma (Johnson y col., 1992; Sapolsky, 2004), inducidos por estímulos o eventos llamados estresores (Pacák y Palkovits, 2001; De Kloet y col., 2005). Estos estímulos impredecibles o nocivos para el animal, alteran dicha homeostasis (Charmandari y col., 2005). La respuesta de estrés es la forma que el organismo busca para restablecer la homeostasis (Chrousos, 2009). La dimensión de la respuesta de estrés se vincula con factores del individuo como ser la experiencia previa con el estresor, el temperamento y la apreciación del estresor por parte del animal (McEwen y Wingfield, 2003). Los estresores se pueden agrupar en tres categorías: a) los factores de estrés psicológicos como miedo y ansiedad; b) los factores de estrés que incluyen un estímulo físico, como shock; y c) factores de estrés que desafían la homeostasis cardiovascular tales como hemorragia y exposición al calor (Van de Kar y Blair, 1999). Se considera que el estrés tiene un efecto positivo cuando permite la adaptación del animal, pero cuando el estrés es crónico,

puede afectar negativamente el crecimiento, la producción, reproducción e inclusive el sistema inmune del animal (Dobson y Smith, 2000; Salak-Johnson y McGlone, 2007). Frente a una situación estresante, se activan simultáneamente dos respuestas: la del sistema nervioso autónomo simpático, que genera una respuesta rápida (segundos a minutos), y la respuesta endócrina, que tarda un poco más (minutos a horas), pero sus efectos persisten por más tiempo (Charmandari y col., 2005).

2.3 Situaciones estresantes

En los sistemas de producción ovina existen varias prácticas de manejo que pueden afectar negativamente al animal generando una respuesta de estrés (Moberg, 2000; Burdick y col., 2010). Algunas de las prácticas estresantes frecuentemente realizadas son la señalada (Edwards y Johnston, 1999), la castración (Melches y col., 2007), el destete (Orgeur y col., 1999), la esquila (Carcangiu y col., 2008), la vacunación, la mezcla de animales de diferentes grupos sociales, la exposición a un nuevo ambiente (Moberg y col., 1980) y el transporte (Orihuela y col., 2002). El ovino es una especie gregaria lo que determina que cualquier manejo que implique la separación de la majada genere una marcada respuesta de estrés (Price y Thos, 1980). El TAS implica la introducción de un animal en un área novedosa donde no tienen contacto visual, olfativo o auditivo con el resto de la majada. Esto genera miedo, reflejado por el aumento de las vocalizaciones, micción, defecación, y un aumento de la actividad locomotora (Forkman y col., 2007).

Como mencionamos anteriormente, hay varias prácticas que implican la separación del animal tanto de su madre como del resto de la majada. Cuando los corderos son destetados artificialmente se genera un estrés emocional muy marcado, no solo debido a la pérdida de la madre, sino también por el estrés nutricional generado (Napolitano y col., 2008; Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016b; Dávila y col., 2019). Al momento de la separación hay un aumento marcado de las vocalizaciones por parte de la oveja y de su cría con mayor frecuencia de costeo sobre el alambrado (Orgeur y col., 1999; Dávila y col., 2019; Iwanka, 2019), indicando una marcada respuesta de estrés tanto en las ovejas como en los corderos. Otra actividad muy frecuente en nuestro sistema de producción ovina es la castración al momento de la señalada, donde los machos responden a la agresión con un aumento del cortisol independientemente del método utilizado (quirúrgico o gomas) (Shutt y col., 1988; del Campo y col., 2009-2010). Otro ejemplo es la esquila, que presenta diferentes componentes estresantes, tales como el movimiento de animales, inmovilización y aislamiento social (Carcangiu y col., 2008). Además, se suman el estrés térmico, por la pérdida de lana y las temperaturas invernales (Corner y col., 2007). En condiciones extensivas de producción ovina, es frecuente que los animales sufran estrés crónico por factores ambientales tales como temperaturas extremas, alta humedad ambiental, vientos fuertes (Silanikove, 2000), sonidos u olores desconocidos (Griffin, 1989) y estados de subnutrición (Freitas-de-Melo y col., 2018). También, el pastoreo en áreas con alta población de predadores provoca un constante estrés agudo o crónico (Grandin, 1998), manifestado por la disminución de las tasas reproductivas (Widman y col., 2017).

2.4 Respuesta aguda de estrés

Como se mencionó anteriormente, frente a una situación estresante, se activan simultáneamente dos respuestas independientemente del tipo del estresor: la del sistema nervioso autónomo simpático y la del sistema endócrino (Kvetňanský y col., 1997; Komesaroff y col., 1998). La activación del sistema nervioso simpático provoca la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al torrente sanguíneo a partir de células que se encuentran en la médula de las glándulas adrenales (Cunningham y col., 2008). Las principales respuestas durante la fase aguda son fisiológicas y comportamentales, como por ejemplo el aumento del estado de excitación, alerta y vigilancia del animal, así como la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria y cardíaca (Cunningham y col., 2008; Sabban, 2010). La expresión del miedo por parte de los animales puede ser demostrada a través del ataque, huida, escape o inclusive inmovilización (Forkman y col., 2007). Además, las catecolaminas generan la movilización de reservas energéticas, aumentando la degradación de glucógeno y la lipólisis con el fin de aumentar la generación de energía por los tejidos del organismo (Cunningham y col., 2008; Pacák y McCarty, 2010). Por otro lado, durante la activación del sistema endócrino, se libera CRH junto con la vasopresina (AVP) en el hipotálamo, estimulando a la hipófisis a secretar ACTH al torrente sanguíneo, esta hormona se une a receptores en la corteza de las glándulas adrenales, estimulando la producción de glucocorticoides (Matteri y col., 2000), siendo el cortisol el principal glucocorticoide secretado en ovinos (Bush y Ferguson, 1953). Cuando hay altos niveles de glucocorticoides en sangre ocurre una retroalimentación negativa, suprimiendo la secreción de CRH, AVP y ACTH (Herman y col., 1996) (Figura 2).

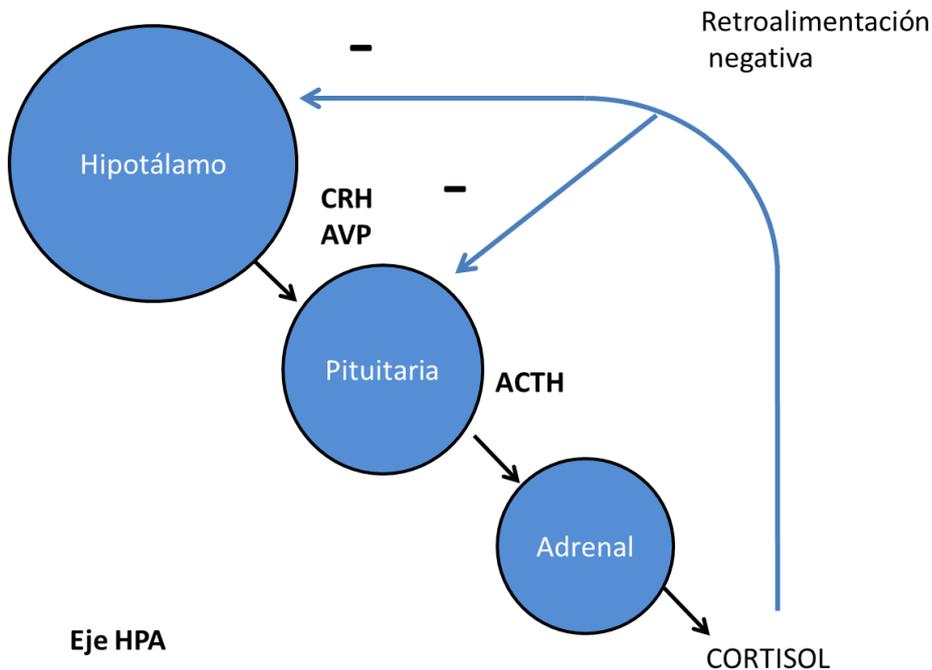


Figura 2. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal con la subsiguiente liberación de cortisol desde la corteza adrenal durante la respuesta de estrés.

Link: <https://www.westonaprice.org/es/health-topics/el-eje-hpa-hipotalamo-pituitaria-adrenal/>

2.5 Respuesta crónica de estrés

La respuesta de estrés pasa a ser crónica cuando los individuos son expuestos a estresores de manera continua o intermitente por períodos largos de tiempo (desde días a semanas). Las altas concentraciones de glucocorticoides por tiempos prolongados generan repercusiones negativas en los animales, pudiendo disminuir el apetito (Selye, 1976; Charmandari y col., 2005) y suprimir el sistema inmunológico predisponiendo al animal a contraer enfermedades (Salak-Johnson y McGlone, 2007). También se reduce el comportamiento sexual, inhibiendo la aparición del estro o retardándolo (Ehnert y Moberg, 1991; Sapolsky y col., 2000). Debido a estos cambios es frecuente que el individuo pierda calidad y cantidad de lana o pelo, disminuya su peso y su eficiencia reproductiva (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016b). Sin embargo, el estrés crónico no siempre es suficientemente intenso como para generar un efecto negativo sobre el ciclo estral (Baron y Brush, 1979). En síntesis, la respuesta adaptativa al estrés permite al animal adaptarse por un período corto de tiempo para aumentar sus probabilidades de sobrevivir (Moberg, 2000; Charmandari y col., 2005); sin embargo, cuando el estresor se mantiene en el tiempo el resultado puede ser negativo para el animal.

2.6 Indicadores de estrés

Debido a que la respuesta de estrés genera cambios comportamentales y fisiológicos, es posible utilizar dichos parámetros para estudiar la existencia de estrés en los animales. En los ovinos, los cambios comportamentales como aumento de la locomoción, de las vocalizaciones, micción y la defecación, son usados comúnmente como indicadores de estrés (Romeyer y Bouissou, 1992; Forkman, 2007). También se puede tener en cuenta el aumento de la FC, FR y de la temperatura corporal debido a que son estudiadas para evaluar la magnitud de la respuesta de estrés. Por ejemplo, en ovejas ocurre un aumento en la temperatura después del TAS (Pedrera-Romano y col., 2010), y en carneros sometidos a electroeyaculación hay un aumento en la frecuencia cardiaca y respiratoria (Damián y Ungerfeld, 2011). Otro indicador de estrés más frecuentemente utilizado es la variación en la concentración de glucocorticoides (Griffin, 1989) y conjuntamente, se podría observar el aumento en la concentración de glucosa en sangre (Pierzchala y col., 2010). Bajo situaciones estresantes se producen modificaciones en las concentraciones de proteínas séricas, tales como proteínas totales, albúmina y globulinas (Abraham y Touron, 2014). Por ejemplo, en ovejas al momento del destete hay una disminución de proteínas totales y globulinas y un aumento en la albúmina (Barbieri y col., 2016; Freitas-de-Melo y col., 2016a). Por lo tanto, es oportuno utilizar diferentes indicadores de estrés, tanto comportamentales, fisiológicos y endocrinos para estudiar la respuesta de estrés ya que la misma puede variar dependiendo del tipo de estresor aplicado.

2.7 Factores que influyen en la respuesta de estrés

Si bien se ha determinado que la secreción de cortisol varía dentro de cierto rango y es liberada de forma circadiana a lo largo del día (Meij y Mol, 2008), las concentraciones de glucocorticoides en sangre también tienen variación individual entre animales sin que los animales estén bajo estímulo de un estresor (Buckingham y col., 1978). Esto se debe a sus diferencias genéticas y experiencias previas, así como también al tipo de estresor y su percepción al mismo (McEwen y Wingfield, 2003; Cockram, 2013). El momento del día influye sobre la respuesta de estrés ya que, por la mañana, en ratas hay mayor secreción de CRH (Hiroshige y Wada-Okada, 1973). A su vez, ovejas que están en fase folicular presentan mayor concentración de cortisol por la mañana que las ovejas en fase luteal (Pinto-Santini y Ungerfeld, 2019). El temperamento es otro factor que afecta la respuesta de estrés en los animales (Burdick y col., 2010), ya que las ovejas nerviosas sometidas a aislamiento tienen mayor concentración de cortisol que las ovejas calmas (Hawken y col., 2012).

Cuanto más reiteradas sean las exposiciones al mismo factor estresante, más lentamente responde el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), ya que el animal conoce al estresor y está más adaptado al mismo (Pacák y McCarty, 2010). Al retirar ovejas del mismo rebaño muchas veces, hay menos manifestaciones comportamentales y endócrinas en su transcurso (Guesdon y col., 2012). De lo contrario, si los animales son expuestos a un ambiente novedoso con la presencia de una persona desconocida, estas manifestaciones se hacen mayores que con la ausencia de la misma (Price y Thos, 1980). Asimismo, hay cierto factor de adaptabilidad frente al mismo evento estresante que varía según el sexo del animal, debido a los esteroides gonadales circulantes (Pacák y McCarty, 2010). Las hembras, tanto ratas como ovejas, producen un aumento mucho más marcado de corticosterona y cortisol respectivamente, que los machos (Kitay, 1963; Handa y col., 1994; Canny y col., 1999; Van Lier y col., 2003a). Además, las ovejas enteras muestran una respuesta al estrés mayor que ovejas ovariectomizadas (Van Lier y col., 2003b). Además de los factores mencionados previamente, la edad del animal juega un rol importante. Por ejemplo, los corderos separados de su madre a los 2 días de vida presentan significativamente mayor concentración de cortisol en sangre que corderos de 28 días de vida, teniendo baja capacidad para adaptarse al estrés emocional (Napolitano y col., 2008). Los corderos son considerados la categoría que más se estresa por ser más reactivos y temerosos que las ovejas adultas (Dwyer, 2004). Las ovejas primíparas reaccionan de manera diferente al parto que las múltiparas (Dwyer, 2003), probablemente porque ven a la nueva cría como algo extraño actuando como una posible fuente de miedo (González-Mariscal y col., 2017). Cuando las madres gestantes sufren eventos estresantes en el último tercio de la gestación, esto se ve posteriormente reflejado en la cría, que secreta niveles basales de cortisol más elevados y presentan menores manifestaciones de miedo (mayor exploración) que las que no sufrieron ese evento (Roussel y col., 2004). Según Grandin (1997), el hecho que un novillo tenga pocas experiencias de manejo humano predispone a que sean más temerosos y, por ende, más susceptibles de estresarse en esa situación. También se ha visto que los terneros criados individualmente son más temerosos que los terneros criados en grupo, ya que demuestran más signos de miedo al entrar en contacto con animales desconocidos o en un ambiente novedoso (Jensen y col., 1997).

2.8 Influencia de los estrógenos, de la progesterona y de la etapa del ciclo estral sobre la respuesta de estrés

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones de E2 y P4 varían a lo largo de las diferentes fases del ciclo estral. A su vez, la concentración de estas hormonas puede influir sobre la respuesta de estrés. Se ha reportado que, en el primer día del ciclo estral, cuando la concentración de E2 es máxima y la de P4 es mínima, aumenta la glucosa plasmática relacionada con un aumento del cortisol (Sosa y col., 2013). Cuando la vaca está en celo, los niveles séricos de cortisol también están en su máximo nivel (Lyimo y col., 2000). En ovejas, las glándulas adrenales presentan receptores para estrógenos, siendo la cantidad de estos mayores en la fase folicular que en la luteal (van Lier y col., 2003a). El animal se vuelve más sensible a factores estresantes con el aumento de E2, teniendo como consecuencia una mayor síntesis y liberación de ACTH y cortisol (Viau y Meaney, 1991; Burgess y Handa, 1992; Sosa y col., 2013).

Por otro lado, un tratamiento con P4 puede atenuar las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés en rumiantes. Esto se debe a que la P4 unida a proteínas hidrosolubles puede atravesar la barrera hematoencefálica y reducir los efectos excitatorios producidos por los receptores de neurotransmisores serotoninérgicos nicotínicos (Valera y col., 1992; Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016a). Complementariamente, la P4 presenta efectos a nivel del sistema nervioso central a partir de los metabolitos neuroactivos, la allopregnanolona y la pregnanolona, que muestran alta afinidad por el receptor GABA_A. Estos metabolitos son los que generan los efectos ansiolíticos e hipnóticos disminuyendo la percepción del animal al estresor (Majewska y col., 1986; Barbaccia, 2001; Akk y col., 2007) y también disminuyen la expresión génica y liberación de la CRH, con consecuente disminución de la secreción de glucocorticoides (Patchev y col., 1994).

Hoy en día es común realizar inseminación artificial en ovinos, para ello se realizan tratamientos hormonales en los animales para sincronización de los celos. Entre los tratamientos realizados, se utilizan dispositivos intravaginales que liberan progesterona similar a la natural (CIDR) de modo de simular el cuerpo lúteo logrando una concentración máxima de P4 sérica a las 2 horas de colocado el mismo (Vilariño y col., 2010). En este sentido, se evaluó el comportamiento de las ovejas con este dispositivo al momento del destete y se observó una disminución en la frecuencia de costeo y en la cantidad de vocalizaciones en comparación a las ovejas control (Freitas-de-Melo y col., 2013). El tratamiento con CIDR en terneras generó una menor distancia de fuga al humano en comparación con las que no se les colocó el CIDR (Freitas-de-Melo y col., 2019). El uso de este tipo de dispositivos sería una buena herramienta para mitigar los efectos adversos del estrés al destete, pero dado que este tratamiento no es viable económicamente ni por cuestiones de manejo, la aplicación de una única inyección de P4 (50 mg) al destete en ovejas en anestro podría ser una buena alternativa, ya que también disminuye la frecuencia de costeo y aumenta el tiempo de rumia (Aramburu y col., 2016). Las ovejas preñadas, y por lo tanto con altas concentraciones de P4, reaccionan menos cuando se someten al aislamiento social que las ovejas vacías, mostrando menos conductas relacionadas con el miedo (Viérin y Bouissou, 2001). Asimismo, Barbieri y col., (2016) observaron que luego de la esquila de ovejas preñadas y vacías, algunas respuestas de estrés como la concentración de cortisol, tiempo caminando y pastoreando fueron menos

pronunciadas en las ovejas gestantes. A modo de resumen, los E2 sensibilizan al animal frente a los factores estresantes (Charmandari y col., 2005), mientras que la P4 disminuye la percepción al factor estresante (Akk y col., 2007).

Existen escasos estudios publicados en ruminantes sobre los efectos de la etapa del ciclo estral sobre la respuesta de estrés (Komesaroff y col., 1998; Orihuela y col., 2002; Uribe-Velazquez y col., 2010), siendo que la mayoría de los trabajos publicados fueron realizados en roedores. Las ratas a diferencia de los ovinos presentan mayores concentraciones de ACTH y de corticosterona durante el proestro que durante las otras fases del ciclo estral (Pollard y col., 1975; Phillips y Poolsanguan, 1978). Kitay y col. (1971) demostraron que los E2 estimulan la síntesis y liberación de ACTH, lo que explicaría los niveles altos de corticosterona en el proestro, por lo que, si se aplica un estresor en esta etapa, ocurre un aumento de corticosterona mayor que en otras etapas del ciclo (Pollard y col., 1975; Viau y Meaney, 1991). El aumento de ACTH se ve también durante el estro, pero va disminuyendo significativamente en el diestro (Critchlow y col., 1963), siendo la respuesta simpática menos intensa en esta última fase (Marcondes y col., 2002). En perras sucede lo mismo: los valores de ACTH son mayores durante el proestro y como consecuencia, hay mayores niveles de cortisol durante el estro, disminuyendo las concentraciones de ambas hormonas en el diestro (Gallelli y col., 2015). Esto demuestra la acción estimulatoria que tienen los E2 sobre la producción de ACTH (Gallelli y col., 2005). En yeguas, al igual que en ovinos, además de haber pocos trabajos publicados, no se encontró diferencias comportamentales según la etapa del ciclo estral (Hedberg y col., 2005).

Las ovejas cíclicas presentan menor concentración de cortisol que las ovejas en anestro (Abraham y Touron, 2014). Sin embargo, esto cambia si las ovejas en anestro son tratadas con P4 ya que, al retirar el CIDR, disminuyen las concentraciones de P4 presentando una mayor respuesta de estrés al aislamiento social (Freitas-de-Melo y col., 2016c). Las concentraciones de cortisol en el plasma son mayores durante el celo, cuando las concentraciones de E2 son máximas y la P4 se encuentra en niveles basales (Sosa y col., 2013).

3. HIPÓTESIS

La etapa del ciclo estral de la oveja modifica la respuesta de estrés al aislamiento social.

4. OBJETIVOS

General

Determinar si la etapa del ciclo estral influye sobre la respuesta al estrés provocada por el aislamiento social en ovejas.

Específicos

Comparar la respuesta al aislamiento social de ovejas en fase folicular y en fase luteal en términos de:

1. números de olfateos, inmobilizaciones, intentos de escape, líneas cruzadas, número de vocalizaciones, eliminaciones (orina y heces) y el tiempo en la periferia durante el aislamiento social.
2. cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria y temperatura corporal.
3. cambios en las concentraciones de proteínas totales, albúmina y globulinas, cortisol y glucosa.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Lugar de estudio, animales y manejo

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria. El trabajo experimental se realizó en el Campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria, Migués, Canelones, Uruguay, durante la estación reproductiva (marzo). Para el estudio se utilizaron 20 ovejas Corriedale, multíparas que se encontraban pastoreando campo natural, con acceso a sombra y agua. Se sincronizó el ciclo estral de las ovejas con dos dosis de un análogo de PGF2-alfa (10 mg, Dinoprost tromethamine, Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, MI, EUA) intramuscular, separadas por 10 días entre sí. Se separó la administración de la PGF2-alfa entre ovejas de forma de lograr tener 10 ovejas en estro (grupo fase folicular: GFF) y 10 en diestro (grupo fase luteal: GFL; días 9-10 poscelo) en forma simultánea. Se controló la manifestación de celo dos veces por día durante 30 min (7:30 h y 18:00 h respectivamente), identificando y destinando a las ovejas que estaban marcadas a un piquete diferente de las otras ovejas del grupo. Para ello, se utilizaron como marcadores 2 capones androgenizados con testosterona (200 mg, ciclopentilpropionato de testosterona y 20 mg lidocaína base por cc, testosterona ultra lenta fuerte, Dispert, Montevideo, Uruguay) intramuscular. Inmediatamente antes de liberar los capones con el lote de ovejas se pintaron los mismos con polvo de color. Los capones descansaban durante el día y permanecían con las ovejas desde las 18:00 h hasta las 7:30 h.

5.2 Test de aislamiento social

El TAS se realizó por la mañana (8:00-10:00) durante tres días consecutivos, alternando en cada día las ovejas que estaban en fase folicular y en fase luteal exponiéndolas una única vez al TAS. La estructura del TAS fue armada dentro de un lugar cerrado y techado (galpón), para minimizar el contacto de las ovejas con el exterior. Las ovejas se aislaron de manera individual durante 10 min en un área de 4 m x 4 m, con el piso dividido en cuadrantes de 1 m x 1 m y con paredes blancas de 2 m de altura que les impedía ver hacia el exterior. Durante el TAS no permaneció ninguna oveja ni persona a menos de 20 m, las actividades de los animales fueron registradas por medio de dos cámaras de video localizadas en diferentes ángulos del corral de prueba. Se realizaron registros comportamentales durante el TAS, incluyendo la cantidad de olfateos, inmovilizaciones, intentos de escape, líneas divisorias cruzadas, vocalizaciones, eliminaciones (orina y heces) y el tiempo de permanencia en los cuadrantes de la periferia. Al registrar las líneas cruzadas y el tiempo en la periferia, consideramos que el animal estaba en un determinado cuadrante cuando sus dos miembros anteriores estaban dentro del mismo. Al finalizar la prueba, las ovejas eran integradas a un corral en el que había otras ovejas de la misma majada para evitar que quedaran solas.

5.3 Frecuencia cardíaca y respiratoria y temperatura corporal

Dichos parámetros se tomaron 5 min antes del TAS (tiempo -5), al salir de la prueba (tiempo 0), a los 10 y 20 min posteriores. La FC se obtuvo mediante auscultación de la

zona cardíaca y la FR fue registrada por conteo de los movimientos torácicos durante un minuto. La temperatura rectal fue tomada con un termómetro digital y las temperaturas superficiales fueron tomadas con un termómetro láser en diferentes zonas sin lana, zona cardíaca, región abdominal y región del periné.

5.4 Obtención de muestras de sangre

Las muestras sanguíneas fueron colectadas por punción de la vena yugular en tubos con iodoacetato y heparina (Eurotubo, Deltalab, Rubí, España) y sin anticoagulantes en los tiempos -5, 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Estas muestras fueron inmediatamente centrifugadas durante 10 min, a una velocidad de 1500 g. Una vez obtenidos el suero y el plasma se congelaron a -20 °C hasta realizar las mediciones posteriores.

5.5 Medición de cortisol y progesterona

La determinación del cortisol sérico fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay) con un kit comercial de radioinmunoanálisis (CORT-CT2, Cisbio Bioassays, Francia). La sensibilidad analítica del ensayo fue de 6,6 nmol/L y el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 15.96%.

Las concentraciones plasmáticas de P4 fueron medidas utilizando un kit de radioinmunoanálisis de fase sólida que contenía tubos recubiertos de anticuerpos y marcados con ¹²⁵I progesterona (ImmuChem TM Coated Tube Progesterone, ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostics Division Costa Mesa, CA, EUA). La sensibilidad de la medición y el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 8,5 % y 0,02 ng/mL, respectivamente. Las concentraciones de P4 fueron utilizadas para corroborar que la oveja estuviera en la fase folicular o luteal (fase folicular: concentraciones debajo de 0,5 ng/mL; fase luteal: concentraciones por encima de 1 ng/mL). Los datos de dos ovejas del grupo de fase luteal fueron eliminados debido a que sus concentraciones de P4 eran de 0,58 ng/mL y 0,64 ng/mL.

5.6 Medición de proteínas totales, albúmina y glucemia

Las proteínas totales, la albúmina y la glucemia fueron medidas utilizando un kit comercial (Bio-Systems, Barcelona, España). Se estimaron las globulinas a partir de la diferencia entre proteínas totales y albumina.

5.7 Análisis estadísticos

Las variables que diferían de la distribución normal (Shapiro-wilk test: $P \leq 0,05$) tales como los números de inmobilizaciones e intentos de escape fueron comparados entre grupos por el test de Mann-Whitney. La cantidad de olfateos, líneas cruzadas, número de vocalizaciones, eliminaciones y el tiempo de permanencia en la periferia se distribuyeron de forma normal (Shapiro-wilk test: $P > 0,05$) y fueron comparadas utilizando un modelo mixto (mixed proc de SAS University Edition). En el modelo se incluyó como efecto fijo la etapa del ciclo estral (efecto grupo) y como efecto aleatorio los animales y el día de realizada la prueba. También se utilizó el modelo mixto del SAS para comparar entre

grupos la frecuencia cardíaca, respiratoria, temperatura cardíaca, abdominal, perineal y rectal, las proteínas totales, albúmina, globulinas, glicemia y cortisol. Se consideró como efecto fijo el tiempo, el grupo y la interacción entre el grupo y el tiempo; y como efectos aleatorio los animales y el día de realizado el test. Todos estos datos son presentados como LSmeans \pm EEM. Consideramos que hubo un efecto cuando $P \leq 0,05$ y una tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,1$. No se consideraron los datos de comportamiento de tres ovejas en fase folicular, ya que se perdieron estos videos.

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros comportamentales

Las ovejas GFF tendieron a vocalizar más veces y a estar una mayor cantidad de veces inmóviles que las GFL ($P=0,10$ para ambos comportamientos: Tabla). No hubo diferencia entre grupos en los demás comportamientos registrados durante el TAS. No hubo registros de intentos de escape.

Tabla 1 Efecto del test de aislamiento social (TAS) sobre el comportamiento (media \pm EEM) de ovejas en celo (GFF; $n=7$) y en fase luteal (GFL; $n=8$).

Actividades	GFF	GFL	P
Nº de olfateos	16,4 \pm 5,2	15,3 \pm 4,9	0,80
Nº de inmobilizaciones	9,9 \pm 2,1	4,4 \pm 2,1	0,10
Nº total de divisiones cruzadas	39,3 \pm 9,2	35,2 \pm 8,6	0,70
Nº de vocalizaciones	7,0 \pm 2,5	1,08 \pm 2,3	0,10
Nº de eliminaciones	1,5 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	0,14
Tiempo en la periferia (seg)	8,7 \pm 0,9	8,6 \pm 0,8	0,90

6.2 Parámetros fisiológicos

6.2.1 Frecuencia cardíaca y respiratoria

No hubo efecto de grupo, ni interacción entre grupo y tiempo. Sin embargo, la FC y la FR cambiaron con el tiempo ($P<0,0001$ y $P=0,02$ respectivamente). La FC alcanzó sus valores máximos al finalizar el TAS ($P<0,0001$), y volvió a los valores iniciales a los 20 min ($P<0,0001$) (Figura 3A). La FR aumentó a los 10 min luego del TAS ($P=0,01$), sin volver a los valores iniciales a los 20 min de finalizado el TAS (Figura 3B).

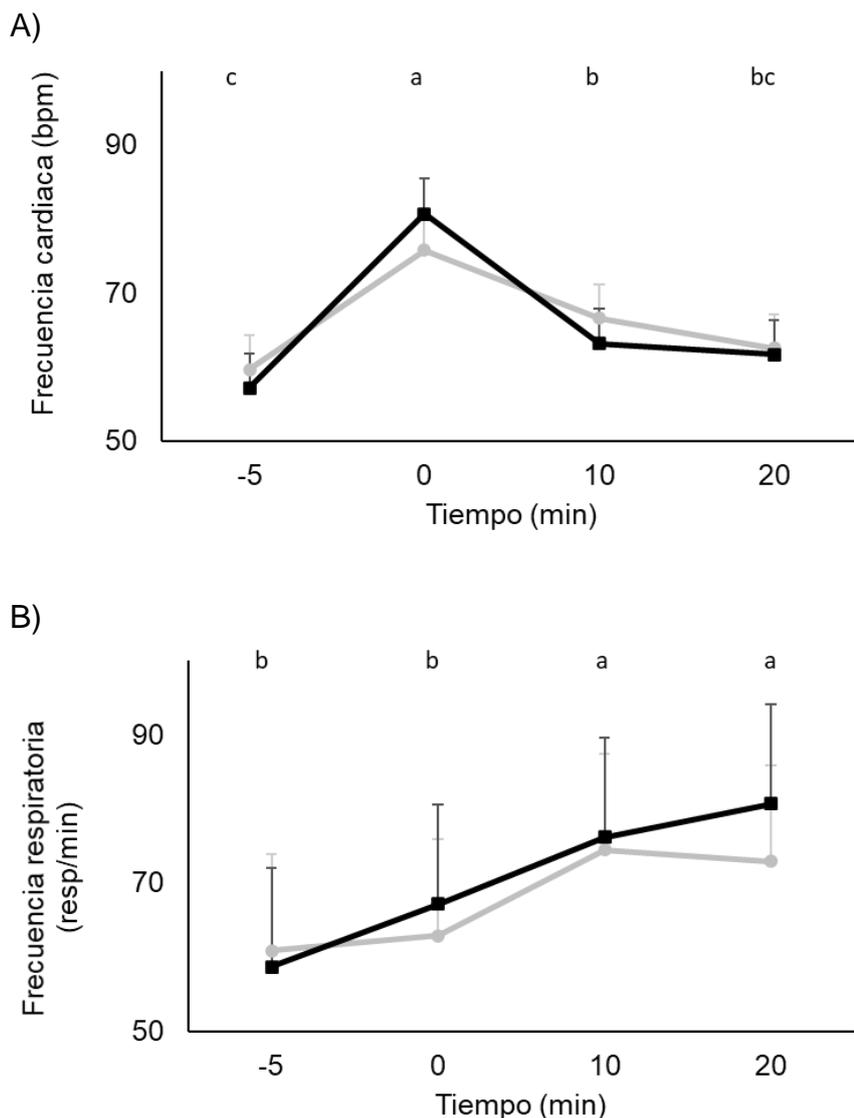


Figura 3. Frecuencia cardíaca (A) y respiratoria (B) en ovejas en fase folicular (●-●) y en fase luteal (■-■), desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social (TAS) hasta 20 minutos después de salir del mismo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($P \leq 0,03$).

6.2.2 Temperaturas superficial y rectal

La temperatura de la región abdominal fue mayor en las ovejas GFF que en las ovejas GFL ($36,3 \pm 0,4$ °C vs $35,2 \pm 0,4$ °C; $P=0,05$, respectivamente). No hubo efecto del tiempo ni interacción entre grupo y tiempo en la temperatura abdominal (Figura 4A). No se detectó ningún efecto en la temperatura de la zona cardíaca. La temperatura rectal cambió con el tiempo ($P<0,0001$), aumentando inmediatamente luego del TAS ($P<0,0001$), y a los 20 min no había regresado a los valores iniciales. No hubo efecto grupo ni interacción entre grupo y tiempo en temperatura rectal (Figura 4B).

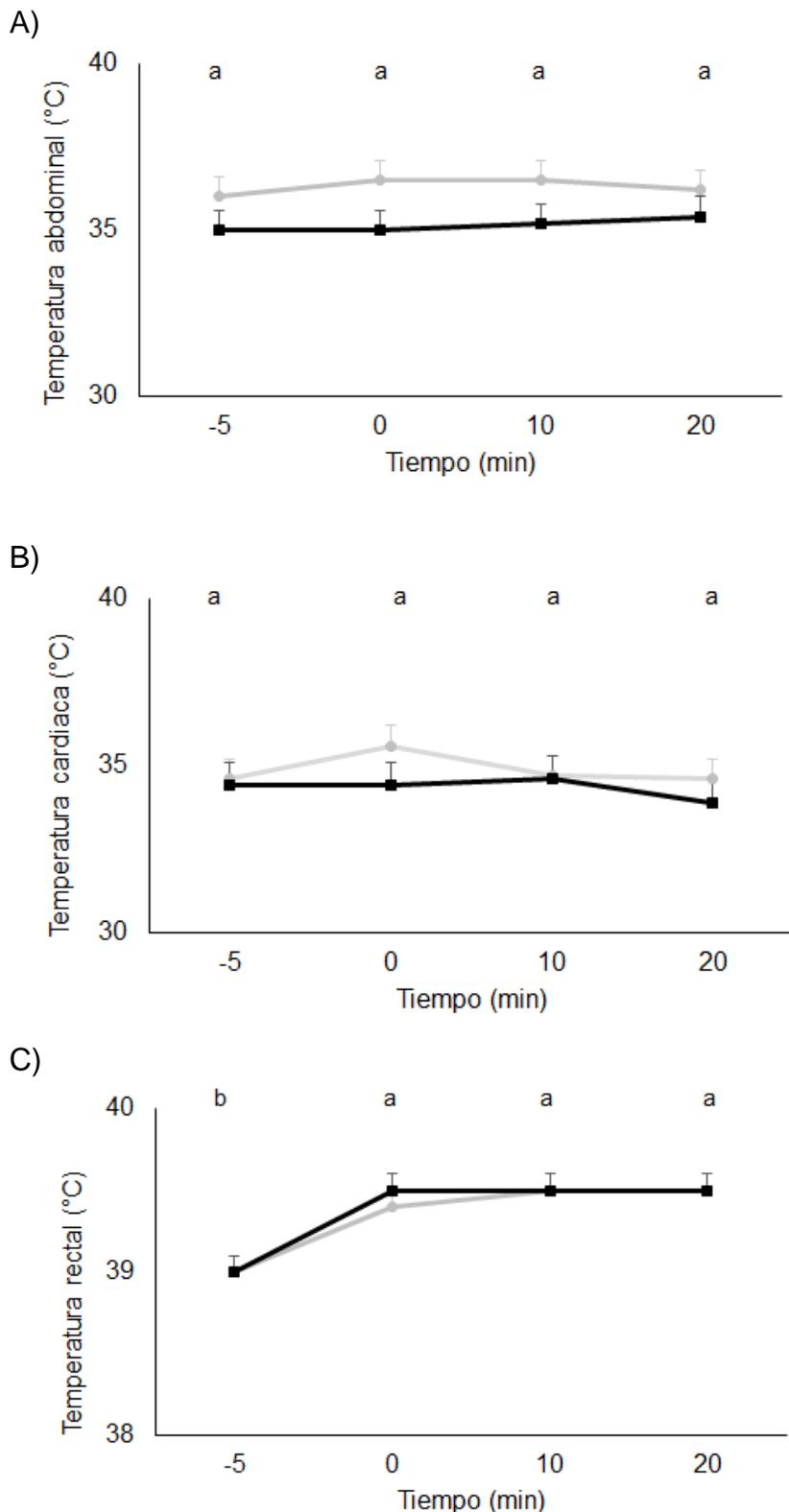


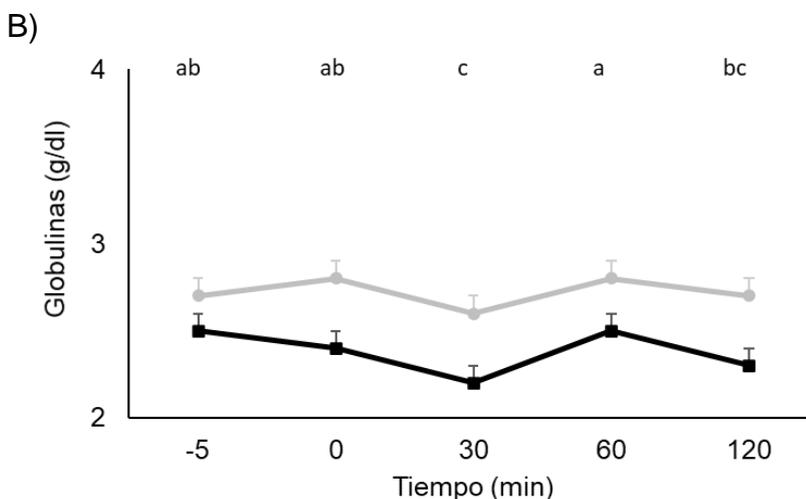
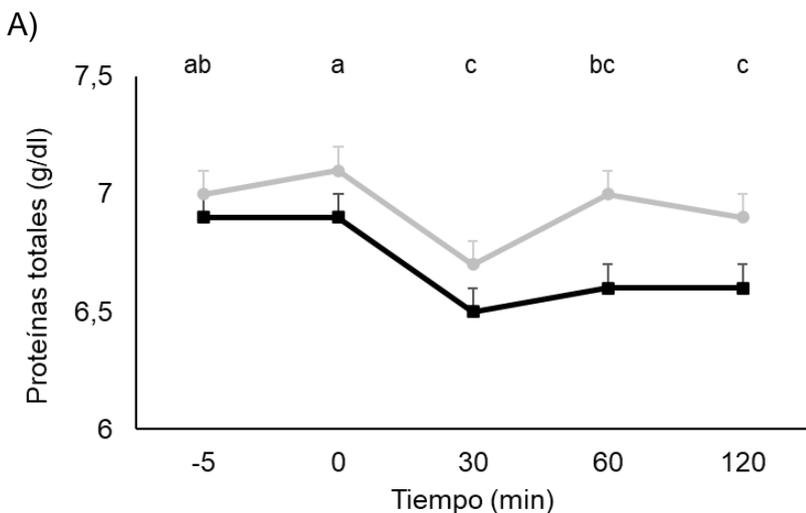
Figura 4 Variación de la temperatura de la región abdominal, zona cardíaca y rectal en ovejas en fase folicular (-●-) y en fase luteal (-■-), desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social (TAS) hasta 20 minutos después de salir de la misma. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($P < 0,0001$).

6.3 Parámetros bioquímicos

Proteínas séricas

Las concentraciones de proteínas totales y de globulinas fueron mayores en las ovejas GFF que en las GFL (proteínas totales, GFF: $7,0 \pm 0,1$ g/dL vs GFL: $6,7 \pm 0,1$ g/dL; $P=0,04$ y globulinas GFF: $2,7 \pm 0,1$ vs GFL: $2,4 \pm 0,1$ g/dL; $P=0,02$ respectivamente). Las concentraciones de proteínas totales y de globulinas cambiaron con el tiempo ($P= 0,0002$ y $P=0,0004$, respectivamente). Ambos grupos de ovejas disminuyeron las concentraciones de proteínas totales ($P<0,0001$) y globulinas ($P=0,003$) a los 30 min de realizado el TAS. Sin embargo, no hubo interacción entre grupo y tiempo para las concentraciones de proteínas totales y globulinas (Figura 5A y B).

La concentración de albúmina varió con el tiempo ($P=0,042$). Hubo una disminución en la concentración de albúmina a los 30 min luego del TAS ($P=0,013$), la que se mantuvo disminuida hasta los 120 min de realizado el TAS (Figura 5C). No hubo efecto de grupo ni interacción grupo y tiempo en la concentración de albúmina.



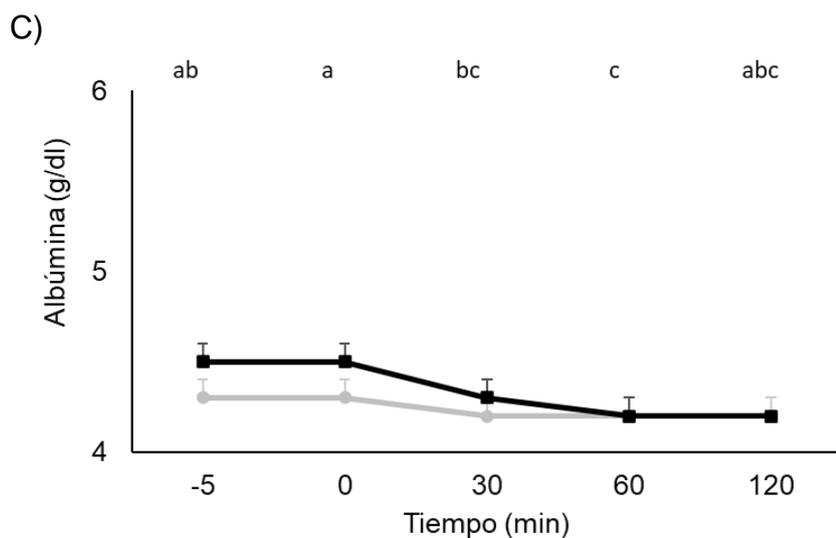


Figura 5. Las concentraciones de (A) proteínas totales, (B) globulinas y (C) albúmina desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social (TAS) hasta 120 minutos después de salir de la misma en ovejas en fase folicular (-●-) y en fase luteal (-■-). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($P \leq 0,04$).

6.4 Cortisol y glicemia

Las concentraciones de cortisol variaron con el tiempo ($P < 0,0001$). Las ovejas GFF y GFL alcanzaron sus niveles máximos de cortisol inmediatamente luego de salir del TAS ($P < 0,0001$), llegando a sus niveles basales a los 120 min ($P < 0,0001$). No hubo efecto grupo ni interacción entre grupo y tiempo (Figura 6).

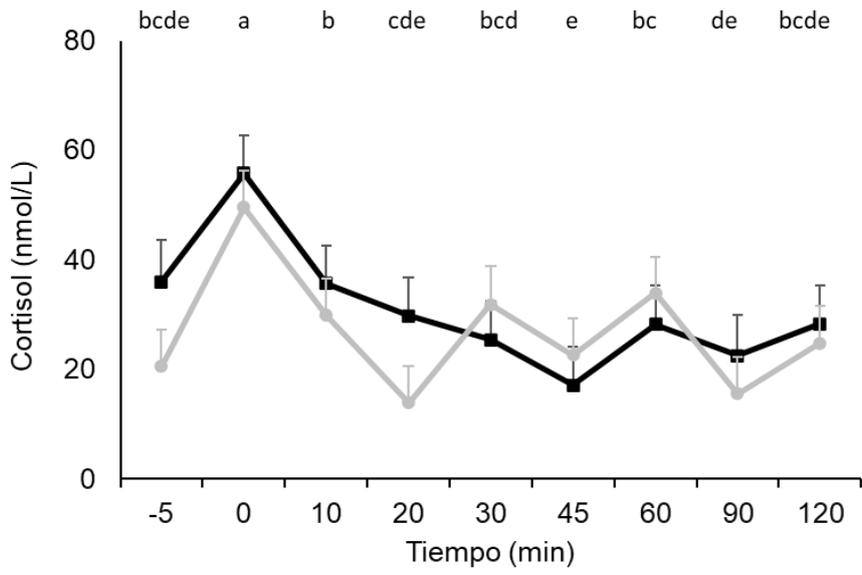


Figura 6. Concentraciones de cortisol en ovejas en fase folicular (-●-) y en fase luteal (-■-), desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social (TAS) hasta 120 minutos después de salir del mismo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($P < 0,0001$).

Para la glicemia no hubo efecto grupo, tiempo ni interacción grupo y tiempo (Figura 5).

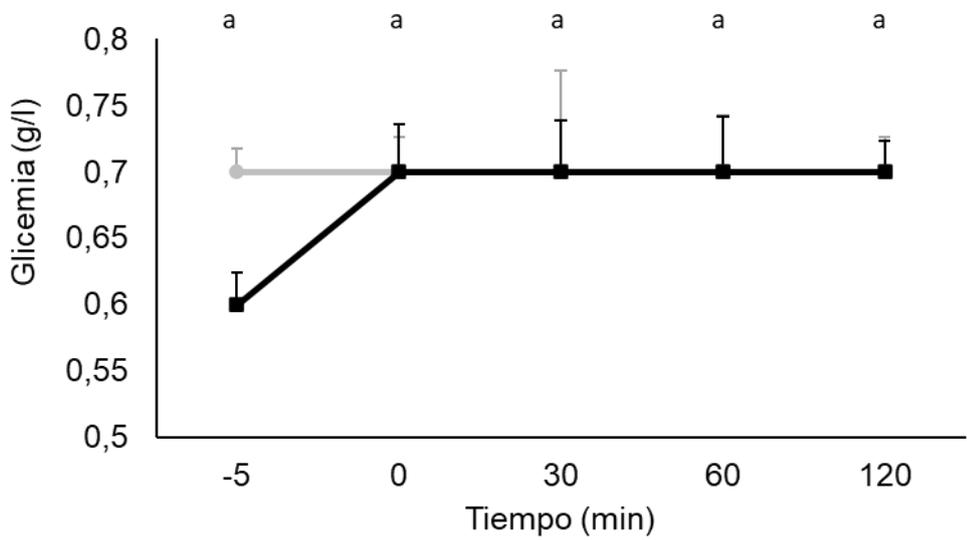


Figura 7. Variación de la glicemia en ovejas en fase folicular (-●-) y en fase luteal (-■-), desde 5 minutos antes de ingresar al test de aislamiento social (TAS) hasta 20 minutos después de salir de la misma. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos ($P = 0,6$).

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que las ovejas en fase folicular tendieron a presentar mayores cambios comportamentales (número de vocalizaciones e inmovilizaciones) durante el test de aislamiento social que las ovejas en fase luteal. En ovinos, el aumento de las vocalizaciones, la locomoción y el número de divisiones cruzadas son considerados como los principales indicadores de estrés al aislamiento social (Viérin y Bouissou, 2001; Guesdon y col., 2015). Por lo tanto, la tendencia encontrada a favor de ovejas GFF aportan indicios de que las ovejas en fase folicular podrían ser más susceptibles a estresarse más con el aislamiento social que las ovejas en fase luteal. Esta diferencia podría estar explicada por los cambios en las concentraciones de E2 y P4, ya que tanto en roedores (Buckingham y col., 1978; Cavigelli y col., 2005), como en ovejas (Cassarino y Magri, 2012; Freitas-de-Melo y col., 2016a) se ha reportado que dichas hormonas influyen en la respuesta de estrés. En efecto, en ratas, la disminución en la concentración de P4 plasmática y el aumento en la concentración de E2 se asocian con una mayor respuesta de estrés (Butcher y col., 1974; Viau y Meaney, 1991). Si bien no se han encontrado diferencias en la respuesta de estrés en ovejas en diferentes fases del ciclo estral (Orihuela y col., 2002), las ovejas preñadas, y por lo tanto con altos niveles de P4, son menos temerosas al aislamiento social que las ovejas vacías (Viérin y Bouissou, 2001). Además, se ha determinado que la administración crónica o aguda de progesterona disminuye la respuesta comportamental y/o fisiológica indicadora de estrés al destete en ovejas (Freitas-de-Melo y col., 2013; Aramburu y col., 2016) y en terneras determina una menor reactividad a diferentes manejos productivos (Freitas-de-Melo y col., 2019). Por lo tanto, en esta tesis, las altas concentraciones E2 durante el celo pueden explicar la tendencia a presentar una conducta diferente asociada a su estado fisiológico.

En este sentido, esta tendencia al aumento de vocalizaciones e inmovilizaciones puede ser un efecto directo de la etapa del ciclo estral debido especialmente a la acción de los E2. Las ovejas próximas al celo tienden a aumentar la actividad locomotora (Da Costa y col., 2004), vocalizar más, a separarse del grupo y permanecer inmóviles durante la estimulación del macho (Hurnik, 1987). Además, la fase del ciclo estral influye sobre las variaciones circadianas de cortisol, observándose un mayor aumento en la concentración de cortisol durante la mañana en ovejas en fase folicular que ovejas en fase luteal (Pinto-Santini y Ungerfeld, 2019). Esto podría explicar la diferencia tendencial en la conducta encontrada en el GFF.

Cuando se activa la respuesta de estrés, hay un aumento de la temperatura rectal y corporal asociado a un aumento de la frecuencia respiratoria como forma de disipar ese calor (Al-Haidary, 2004), ya que estos cambios fisiológicos son necesarios para prevenir la hipertermia (Lowe y col., 2001). Debido a la redistribución del flujo sanguíneo se tomó la temperatura superficial en la zona cardíaca, abdominal y periné, ya que son zonas donde no interfiere la lana para realizar estas mediciones. Por otro lado, está reportado que la temperatura rectal y vaginal son mayores en las ovejas en estro que en ovejas en fase luteal (Barros de Freitas y col., 2018) y en forma similar, previo a la ovulación aumenta la temperatura vaginal en vaquillonas (Mosher y col., 1990; Talukder y col., 2015). En este sentido, y a pesar que no se presentaron diferencias a nivel de la temperatura rectal, la temperatura en la región abdominal fue mayor para el GFF que el GFL previo al TAS (min -5) lo que nos hace atribuirlo a un efecto directo del celo.

Las mayores concentraciones de proteínas totales y globulinas observadas en las ovejas del GFF estaría explicada por diferencias basales en la etapa del ciclo estral. Las ovejas ciclando presentan modificaciones en las concentraciones de proteínas séricas en comparación con las ovejas en anestro (Abraham y Touron, 2014), determinado también en otras especies, como vacas (Virmani y col., 2011) y búfalas (Kalsotra y col., 2010). Con la aplicación del TAS hubiésemos esperado la disminución de las proteínas totales y globulinas, por lo que consideramos que el aumento encontrado pudo estar influenciado por un menor consumo de agua en las ovejas del GFF (Jaber y col., 2004). Probablemente, además, la disminución de las proteínas totales después de salir del TAS y la variación a lo largo del experimento se deba a los efectos del cortisol sobre el catabolismo de las proteínas (Marai y col., 2007). La mayor concentración de globulinas en ovejas del GFF podría deberse a que, en mamíferos, el aumento de la temperatura corporal mejora la función de los glóbulos blancos (Welch, 1992).

El TAS es probablemente uno de los tests más estresantes utilizado en especies gregarias para determinar la respuesta de miedo y estrés (Tilbrook y col., 1999; Forkman y col., 2007). De hecho, en este estudio, el TAS generó una marcada respuesta de estrés en las ovejas independientemente de la etapa del ciclo estral, generando cambios en las concentraciones de cortisol. Aunque el cortisol sea una hormona con mucha variabilidad en la respuesta y de vida media corta, la misma es considerada uno de los principales indicadores de estrés en ovinos (Cooper y col., 1995; Warris y col., 1995; Cockram, 2013). Se detectó el máximo aumento de los niveles séricos de cortisol inmediatamente luego del test y lograron restablecer rápidamente esos valores a los 10 minutos de realizado, variando sus concentraciones a lo largo del experimento. En conjunto con el aumento de las concentraciones de cortisol, esperábamos también, un aumento de la glicemia por el efecto del cortisol sobre el metabolismo energético pero los niveles de glicemia no variaron antes ni después del TAS (Baxter y Forsham, 1972; Shamoon y col., 1980; De Feo y col., 1989). Al salir del test, las ovejas tuvieron un gran aumento de la FC, como consecuencia del aislamiento social (Da Costa y col., 2004), volviendo a los valores iniciales a los 20 min de finalizado el TAS probablemente debido a que la FC presenta un ritmo diurno, con niveles mínimos durante las primeras horas de la mañana (Al-Haidary, 2004). La FR también aumentó al salir de la prueba, pero no llegó al máximo en ese momento, si no que continuó aumentando. En este sentido, la temperatura rectal también aumentó con el TAS y no volvió a sus valores iniciales. Pedernera-Romano y col. (2010) y Damián y Ungerfeld (2011) también observaron un aumento en estas variables en ovejas sometidas al aislamiento social. El hecho de que la FR y la temperatura rectal no hayan regresado a sus valores iniciales podría haber sido debido a que el estresor fue intenso, superando la propia capacidad de los sistemas termorregulatorios, ya que la temperatura promedio en los días que se realizó la prueba fueron neutras (promedio de 19 °C). Si bien ambos grupos de animales percibieron el TAS como un evento estresante, pensamos que el manejo previo realizado con los ovinos en las mismas instalaciones donde se realizó el test pudo influir en los resultados obtenidos ya que esperábamos una mayor respuesta de estrés en las ovejas del GFF.

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, no hay información suficiente para concluir que la etapa del ciclo estral modifica la respuesta de estrés al aislamiento social en ovejas. De todas formas, hubo tendencias en dos variables comportamentales (mayor número de vocalizaciones e inmobilizaciones) y un efecto en una variable fisiológica (mayor temperatura en región abdominal) a favor de las ovejas en fase folicular. La mayor concentración de proteínas séricas (proteínas totales y globulinas) obtenidas en las ovejas del grupo de fase folicular se vinculan más a la etapa del ciclo estral pero no a la respuesta de estrés debida al aislamiento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abella, F. (1993). Principios de Fisiología Ovina. Montevideo, Hemisferio Sur, 254 p.
2. Abraham, P., Touron, J. (2014). Efectos del tratamiento con progesterona sobre la respuesta fisiológica y comportamental de estrés al destete temprano en ovejas en anestro. Tesis. Facultad de Veterinaria, Udelar, 40 p.
3. Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., Mennerick, S. (2007). Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 116: 35–57.
4. Al-Haidary, A.A., 2004. Physiological responses of Naimey sheep to heat stress challenge under semi-arid environments. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2: 307–309.
5. Aramburu, J. C., Brit, J. I., Castells, F., (2016). Efectos del tratamiento con progesterona inyectable en el momento del destete sobre la respuesta de estrés de ovejas en anestro. Tesis. Facultad de Veterinaria, Udelar, 33 p.
6. Barbaccia, M. L., Serra, M., Purdy, R. H., Biggio, G. (2001). Stress and neuroactive steroids. *Neurosteroids and Brain Function*, 46: 243–272.
7. Barbieri Acuña, V., Fernández Werner, M., Laguzzi Rosas, M. (2016). Cambios comportamentales en ovejas preñadas y vacías luego de la esquila invernal. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República, 46 p.
8. Barros de Freitas, A. C., Ortiz Vega, W. H., Quirino, C. R., Bartholazzi Junior, A., Gomes David, C. M., Geraldo, A. T., Silva Rua, M. A., Cipagauta Rojas, L. F., de Almeida Filho, J. E., Burla Dias, A. J. (2018). Surface temperature of ewes during estrous cycle measured by infrared thermography. *Theriogenology*, 119: 245–251.
9. Baron, S., Brush, F. R. (1979). Effects of acute and chronic restraint and estrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. *Hormones and Behavior*, 12: 218–224.
10. Bartlewski, P.M., Beari, A.P., Rawlings, N.C. (1999). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, 52: 115-130.
11. Baxter, J. D., Forsham, P. H. (1972). Tissue effects of glucocorticoids. *The American Journal of Medicine*, 53: 573–589.
12. Bittman, E. L., Karsch, F. J., Hopkins, J. W. (1983). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 113: 329–336.

13. Buckingham, J. C., Dohler, K.-D., Wilson, C. A. (1978). Activity of the Pituitary-Adrenocortical System and thyroid gland during the oestrus cycle of the rat. *Journal of Endocrinology*, 78: 359–366.
14. Burdick, N. C., Carroll, J. A., Hulbert, L. E., Dailey, J. W., Willard, S. T., Vann, R. C., Welsh, T.R., Randel, R. D. (2010). Relationships between temperament and transportation with rectal temperature and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. *Livestock Science*, 129: 166–172.
15. Burgess, L. H., Handa, R. J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*, 131: 1261–1269.
16. Bush, I. E., Ferguson, K. A. (1953). The secretion of the adrenal cortex in the sheep. *Journal of Endocrinology*, 10: 1–8.
17. Butcher, R. L., Collins, W. E, Fugo, N. W. (1974). Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology*, 94: 1704–1708.
18. Canny, B.J., O'Farrell, K.A., Clarke, I.J. Tilbrook, A.J. (1999). The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis of the sheep. *Journal of Endocrinology* 162: 215–25.
19. Carcangiu, V., Vacca, G.M., Parmeggiani, A., Mura, M.C., Pazzola, M., Dettori, M.L., Bini, P.P. (2008). The effect of shearing procedures on blood levels of growth hormone, cortisol and other stress haematochemical parameters in Sarda sheep. *Animal*, 2: 606-612.
20. Cassarino, M., Magri, G. (2012). Caída de la progesterona: respuesta al estrés de aislamiento y cambios comportamentales en borregas en anestro. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 40 p.
21. Cavigelli, S. A., Monfort, S. L., Whitney, T. K., Mechref, Y. S., Novotny, M., McClintock, M. K. (2005). Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *Journal of Endocrinology*, 184: 153–163.
22. Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67: 259-284.
23. Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5: 374–381.
24. Corner, R.A., Kenyon, P.R., Stafford, K.J., West, D.M., Oliver, M.H. (2007). The effect of mid-pregnancy shearing and litter size on lamb birth weight and postnatal plasma cortisol response. *Small Ruminant Research* 73:115-121.

25. Cooper, C., Evans, A. C. O., Cook, S., Rawlings, N. C. (1995). Cortisol, progesterone and β -endorphin response to stress in calves. *Canadian Journal of Animal Science*, 75: 197–201.
26. Cockram, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology*, 181: 45–58.
27. Critchlow, V., Liebelt, R. A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W., Lipscomb, H. S. (1963). Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *American Journal of Physiology* 205: 807–815.
28. Crossley, K. J., Walker, D. W., Beart, P. M., Hirst, J. J. (2000). Characterisation of GABAA receptors in fetal, neonatal and adult ovine brain: region and age related changes and the effects of allopregnanolone. *Neuropharmacology*, 39: 1514–1522.
29. Cunningham J.C., Bradley, K.G. (2008). *Fisiología veterinaria*. 4ª ed. Barcelona, Elsevier, 700 p.
30. Da Costa, A. P., Leigh, A. E., Man, M.-S., Kendrick, K. M. (2004). Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271: 2077–2084.
31. Damian, J.P., Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated ram to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 646-650.
32. Dávila, M., Guala, A., Uribe, M. (2019). Efecto del sexo en la respuesta de estrés al destete artificial en corderos. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR; 1688-6909
33. De Feo, P., Perriello, G., Torlone, E., Ventura, M. M., Fanelli, C., Santeusano, F., Brunetti, P., Gerich, J. E., Bolli, G. B. (1989). Contribution of cortisol to glucose counterregulation in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 257: 35–42.
34. De Kloet, E.R., Joëls, M. Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6: 463-475.
35. Del Campo, M., Hernández, S., Ferron, M., Soares de Lima, J.M., Bottero, D., Piñeiro, J., Rodríguez, H., Moreira, E., Rovira, F., Frugoni, J.C., Levratto, J., Mondragón, J., Albernaz, F., Barreto, J., Presa, A., Arce, J., De Barbieri, I. (2009-2010). Evaluación de la respuesta biológica de estrés de corderos, frente a diferentes métodos de castración y descole. Congreso Asociación Uruguaya de Producción Animal. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9087/1/AUPA-2018p145.pdf> Fecha de consulta: 05-05-20.

36. Dobson, H., Smith, R. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction?. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 743–752.
37. Dwyer, C. (2003). Behavioural development in the neonatal lamb: effect of maternal and birth-related factors. *Theriogenology*, 59: 1027–1050.
38. Dwyer, C.M., (2004). How has the risk of predation shaped the behavioural responses of sheep to fear and distress?. *Animal Welfare* 13: 269–281.
39. Edwards, D.S., Johnston, A.M. (1999). Welfare implications of sheep ear tags. *Veterinary Record*, 144: 603-606.
40. Ehnert, K., Moberg, G. P. (1991). Disruption of estrous behavior in ewes by dexamethasone or management-related stress. *Journal of Animal Science*, 69: 2988–2994.
41. Fierro, S., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J. (2016). Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Animal Reproduction Science*, 167: 74–82.
42. Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.-C., Canali, E., Jones, R. B. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior*, 92: 340–374.
43. Freitas-de-Melo, A., Banchemo, G., Hötzel, M. J., Damián, J. P., Ungerfeld, R. (2013). Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal*, 7: 1367–1373.
44. Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R. (2016a). Progesterona y respuesta de estrés: mecanismos de acción y sus repercusiones en rumiantes domésticos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7: 185-199.
45. Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R. (2016b). Destete artificial en ovinos: respuesta de estrés y bienestar animal. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7:361-375.
46. Freitas-de-Melo A., Damián, J., Hötzel, M., Banchemo, G., Ungerfeld, R. (2016c). Progesterone pretreatment increases the stress response to social isolation in ewes. *Hormones*, 15: 81-87.
47. Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., Orihuela, A., Hötzel, M. J., Pérez-Clariget, R., (2018). Restricción alimenticia durante la gestación y vínculo madre-cría en ovinos: una revisión. *Veterinaria*, 54:27-36.
48. Freitas-de-Melo, A., Orihuela, A., Magri, G., Cruz, B. D., Rubio, I., Corro, M., Alonso, M.A., Ungerfeld, R. (2019). Physiological reproductive status and progesterone concentration affect the results of tests to measure temperament traits in female beef cattle. *Livestock Science*. 221:39-43.

49. Gallelli, M. F., Monachesi, N., Miceli, D. D., Cabrera, M. F., Gomez, N. V., Castillo, V. A. (2005). Plasma ACTH, α -MSH and cortisol variations in the dog during the oestrous cycle in different photoperiods. *Veterinari Medicina* 60: 567–577.
50. Gallelli, M.F., Monachesi, N., Miceli, D., Cabrera Blatter, M.F., Gómez, N., Meikle, A., Castillo, V. (2015). Plasma ACTH, α -MSH and cortisol variations in the dog during the oestrous cycle in different photoperiods. *Veterinaria Medicina*, 60(10):567-577. ESTA REFERENCIA ESTA REPETIDA. LA 58 DICE CABRERA Y LA 59 DICE CABRERA BLATTER.
51. Goldman, B. D. (2001). Mammalian Photoperiodic System: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16: 283–301.
52. González-Mariscal, G., Burt, A. S., Nowak, R. (2017). Behavioral and neuroendocrine indicators of well-being in farm and laboratory mammals. *Hormones*. En: Pfaff, D.W., Joels, M. *Brain and Behavior*. Amsterdam, Elsevier, p. 453–485.
53. Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, 75: 249–257.
54. Grandin, T. (1998). Review: reducing handling stress improves both productivity and welfare. *The Professional Animal Scientist*. 14:1-10.
55. Griffin, J. F. T. (1989). Stress and immunity: A unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20: 263–312.
56. Guesdon, V., Ligout, S., Delagrangé, P., Spedding, M., Lévy, F., Laine, A.-L., Chaillou, E. (2012). Multiple exposures to familiar conspecific withdrawal is a novel robust stress paradigm in ewes. *Physiology & Behavior*, 105: 203–208.
57. Guesdon, V., Meurisse, M., Chesneau, D., Picard, S., Lévy, F., Chaillou, E. (2015). Behavioral and endocrine evaluation of the stressfulness of single-pen housing compared to group-housing and social isolation conditions. *Physiology & Behavior*, 147: 63–70.
58. Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18: 385–403.
59. Handa, R. J., Burgess, L. H., Kerr, J. E., O'Keefe, J. A. (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Hormones and Behavior*, 28: 464–476.
60. Hansel, W., Concannon, P. W., Lukaszewska, J. H. (1973). Corpora Lutea of the Large Domestic Animals. *Biology of Reproduction*, 8: 222–245.
61. Hawken, P. A. R., Luckins, N., Tilbrook, A., Fiol, C., Martin, G. B., Blache, D. (2012). Genetic selection for temperament affects behaviour and the secretion of adrenal and reproductive hormones in sheep subjected to stress. *Stress*, 16: 130–142.

62. Hedberg Y., Dalin A.M., Ohagen P., Holm K.R., Kindahl H. (2005). Effect of Oestrous-cycle Stage on the Response of Mares in a Novel Object Test and Isolation Test. *Reproduction in Domestic Animals*, 40:480-488.
63. Heesch, C. M., Rogers, R. C. (1995). Effects of pregnancy and progesterone metabolites on regulation of sympathetic outflow. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22: 136–142.
64. Herman, J. P. Prewitt, C. M., Cullinan, W. E. (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Critical Reviews Neurobiology*, 10: 371–394.
65. Hawkinson, J. E., Kimbrough, C. L., McCauley, L. D., Bolger, M. B., Lan, N. C., Gee, K. W. (1994). The neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one is a two-component modulator of ligand binding to the GABAA receptor. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 269: 157–163.
66. Hiroshige, T., Wada-Okada, S. (1973). Diurnal changes of hypothalamic content of corticotropin-releasing activity in female rats at various stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 12: 316–319.
67. Hurnik, J. F. (1987). Sexual Behavior of Female Domestic Mammals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3 :423–461.
68. Iwanka, N. (2019). Efecto de diferentes ofertas de forraje en ovejas durante la gestación: comportamiento maternal al parto y respuesta de estrés al destete abrupto. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 36 p.
69. Jaber, L., Habre, A., Rawda, N., Abi Said, M., Barbour, E., & Hamadeh, S. (2004). The effect of water restriction on certain physiological parameters in Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, 54: 115–120.
70. Jainudeen, M., Wahid, H., Hafez, E. (1985). Ciclos reproductivos. Ovejas y Cabras. En: Hafez, E. Reproducción e inseminación artificial en animales. México, Interamericana, p. 177 – 187.
71. Jensen, M. B., Vestergaard, K. S., Krohn, C. C., Munksgaard, L. (1997). Effect of single versus group housing and space allowance on responses of calves during open-field tests. *Applied Animal Behaviour Science*, 54: 109–121.
72. Johnson, E., Kamilaris, T., Chrousos, G., Gold, P., (1992). Mechanisms of stress. A dynamic overview of hormonal and behaviour homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 16:115-130.
73. Kalsotra, R., Sharma, U., Kumar, S., Kumar, S., Hussain, H (2010). Studies on changes in hemato-biochemical and enzymatic profile in postpartum anestrus Murrah buffaloes with hormonal protocols. *Buffalo Bulletin*, 35: 723-729.

74. Kitay, J. I. (1963). Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement 1. *Endocrinology*, 73: 253–260.
75. Kitay, J. I., Coyne, M. D., Swygert, N. H. (1971). Effects of hypophysectomy and administration of cortisone or ACTH on adrenal 5 α -reductase activity and steroid production. *Endocrinology*, 89: 432–438.
76. Komesaroff, P. A., Esler, M., Clarke, I. J., Fullerton, M. J., Funder, J. W. (1998). Effects of estrogen and estrous cycle on glucocorticoid and catecholamine responses to stress in sheep. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 275: 671–678.
77. Kvetňanský, R., Pacák, K., Sabban, E. L., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1997). Stressor Specificity of Peripheral Catecholaminergic Activation. *Advances in Pharmacology*, 42:556–560.
78. Lindheim, S. R., Legro, R. S., Bernstein, L., Stanczyk, F. Z., Vijod, M. A., Presser, S. C., Lobo, R. A. (1992). Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167: 1831–1836.
79. Lowe, T. E., Cook, C. J., Ingram, J. R., & Harris, P. J. (2001). Impact of climate on thermal rhythm in pastoral sheep. *Physiology & Behavior*, 74: 659–664.
80. Lyimo, Z. C., Nielen, M., Ouweltjes, W., Kruij, T. A. M., Eerdenburg, F. J. C. M. van. (2000). Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*, 53: 1783–1795.
81. Majewska, M., Harrison, N., Schwartz, R., Barker, J., Paul, S. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232: 1004–1007.
82. Marai, I. F. M., El-Darawany, A. A., Fadiel, A., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2007). Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Ruminant Research*, 71: 1–12.
83. Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 609–614.
84. Matteri, R.L., Carroll, J.A. Dyer, C.J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. En: Moberg, G.P., Mench, J.A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. 2^a ed. Walingford, CABI, p 43-76.
85. McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K., Samuelsson, B. (1972). Prostaglandin F $_{2\alpha}$ identified as a Luteolytic Hormone in Sheep. *Nature New Biology*, 238: 129–134.

86. McEwen, B. S., Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43: 2–15.
87. Meij, B.P., Mol, J.A. (2008). Adrenocortical Function. En: Meij, B.P., Mol, J.A. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Burlington, Elsevier, p. 605–622.
88. Melches, S., S.C. Mellema, M.G. Doherr, B. Wechsler, A. Steiner. (2007). Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in lambs over 10 weeks of age. *Veterinary Journal*, 173: 554–563.
89. Moberg, G.P., Anderson, C.O., Underwood, T.R. (1980). Ontogeny of the adrenal and behavioral responses of lambs to emotional stress. *Journal of Animal Science*, 51: 138-142.
90. Moberg, G.P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. En: Moberg GP, Mench JA. *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford, CAB, p. 1-21.
91. Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127: 1375–1384.
92. Mosher, M. D., Ottobre, J. S., Haibel, G. K., Zartman, D. L. (1990). Estrual rise in body temperature in the bovine II. The temporal relationship with ovulation. *Animal Reproduction Science*, 23: 99–107.
93. Napolitano, F., De Rosa, G., Sevi, A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 110: 58–72.
94. Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (2001). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. En: Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W. *Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics*. 8^a ed. London, Sanders, p.1-53.
95. Orihuela, A., Sánchez-Mejorada, H., Toledo, M. (2002). Effect of short transport during di-oestrus and pro-oestrus on cortisol levels and oestrous behaviour of sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 138: 93-96.
96. Orgeur, P., Bernard, S., Naciri, M., Nowak, R., Schaal, B., Levy, F. (1999). Psychological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 39 :231-244.
97. Pacák, K., Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*, 22: 502–548.
98. Pacák, K., McCarty, M. Acute stress response (2010). *Stress Science: Neuroendocrinology*. Melbourn, Academic, p 367-374.

99. Patchev, V. K., Shoaib, M., Holsboer, F., Almeida, O. F. X. (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.
100. Pedernera-Romano, C., Ruiz de la Torre, J.L., Badiella, L., Manteca, X. (2010). Effect of perphenazine enanthate on open-field test behaviour and stress-induced hyperthermia in domestic sheep. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 3: 329-32.
101. Phillips, J. G., Poolsanguan, W. (1978) A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *Journal of Endocrinology*, 77:283-291.
102. Pierzchała, K., Niezgodą, J., Bobek, S. (2010). The Effect of Isolation on Plasma Cortisol, Glucose and Free Fatty Acids in Sheep. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe A*, 32: 140–145.
103. Pinto-Santini, L., Ungerfeld, R. (2019). The phase of the estrous cycle modifies the endocrine, metabolic and behavior rhythms in ewes. *Physiology & Behavior*, 204: 324-335.
104. Pollard, I., White, B. M., Bassett, J. R., Cairncross, K. D. (1975). Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. *Behavioral Biology*, 14: 103–108.
105. Price, E. O., Thos, J. (1980). Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats. *Applied Animal Ethology*, 6: 331–339.
106. Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., & Gosling, J. P. (1981). Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. *Reproduction*, 61(2), 265–272.
107. Romeyer, A., Bouissou, M.-F. (1992). Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 34: 93–119.
108. Rosa, H. J., Bryant, M. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48: 155–171.
109. Roussel, S., Hemsworth, P., Boissy, A., Duvaux-Ponter, C. (2004). Effects of repeated stress during pregnancy in ewes on the behavioural and physiological responses to stressful events and birth weight of their offspring. *Applied Animal Behaviour Science*, 85: 259–276.
110. Sabban, E.L. (2010) Catecholamines and stress. En: Soreq, H., Friedman, A., Kaufer, D. *Stress. From molecules to behavior: a comprehensive analysis of the neurobiology of stress responses*. Weinheim, Wiley, p. 19-36.

111. Salak-Johnson, J. L., McGlone, J. J. (2007). Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle¹. *Journal of Animal Science*, 85: 81–88.
112. Sapolsky, R. M., Romero, L. M., Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21: 55–89.
113. Sapolsky, R.M. (2004). Social status and health in humans and other animals. *Annual Review of Anthropology*, 33: 393-418.
114. Selye, H. (1976). Stress without distress. En: Serban, G. *Psychopathology of Human Adaptation*. Boston, Springer, p. 137–146.
115. Senger P.L. (1999). The Estrous Cycle Terminology and Basic Concepts, Pathways to Pregnancy and Parturition. Ed. *Current Conceptions*. Pullman, WA, 34: 49 – 59.
116. Senger, L. P. (2003). Regulation of Reproduction. En: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^a ed. Washington, Current Conceptions, p. 111-121.
117. Senger, P.L. (2005). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^a ed. Pullman, Current Conception, 381 p.
118. Shamoon, H., Soman, V., Sherwin, R. S. (1980). The Influence of Acute Physiological Increments of Cortisol on Fuel Metabolism and Insulin Binding to Monocytes in Normal Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 50: 495–501.
119. Shutt, D. A., Fell, L. R., Connel, R., Bell, A. K. (1988). Stress responses in lambs docked and castrated surgically or by the application of rubber rings. *Australian Veterinary Journal*, 65: 5–7.
120. Silanikove, N. (2000). Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science*, 67: 1–18.
121. Sosa, C., Forcada, F., Meikle, A., Abecia, J. A. (2013). Increase in ovine plasma cortisol at oestrus and its relation with the metabolic status during the sexual cycle in sheep. *Biological Rhythm Research*, 44: 445–449
122. Squires, E. J. (2003). *Applied Animal Endocrinology*. Wallingford, CABI, 234 p.
123. Talukder, S., Thomson, P. C., Kerrisk, K. L., Clark, C. E. F., Celi, P. (2015). Evaluation of infrared thermography body temperature and collar-mounted accelerometer and acoustic technology for predicting time of ovulation of cows in a pasture-based system. *Theriogenology*, 83: 739–748.
124. Tilbrook, A.J., Canny, B.J., Serapiglia, M.D., Ambrose, T.J., Clarke, I.J. (1999). Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. *Journal of Endocrinology*, 160: 469–481

125. Thorburn, G. D., Bassett, J. M., Smith, I. D. (1969). Progesterone concentration in the peripheral plasma of sheep during the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 45: 459–469.
126. Thun, R., Kaufmann, C., Janett, F. (1998). The Influence of Restraint Stress on Reproductive Hormones in the Cow. *Reproduction in Domestic Animals*, 33: 255–260.
127. Ungerfeld, R. (2002). Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, p. 39- 53.
128. Uribe-Velásquez, L.F., Uribe, A.I., Valencia-Uribe, S. (2010). Efecto del estrés provocado por la ecografía sobre las concentraciones plasmáticas de cortisol y progesterona (P4) durante el ciclo estral en ovejas. *Veterinaria y Zootecnia*, 4:9-15.
129. Valera, S., Ballivet, M., Bertrand, D. (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 9949–9953.
130. Van Lier, E., Meikle, A., Bielli, A., Akerberg, S., Forsberg, M., Sahlin, L. (2003). Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Domestic Animal Endocrinology*, 25: 373-387.
131. Van Lier, E., Pérez-Clariget, R., Forsberg, M. (2003). Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 79: 81–92.
132. Van de Kar, L. D., Blair, M. L. (1999). Forebrain Pathways Mediating Stress-Induced Hormone Secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20: 1–48.
133. Viau, V., Meany, M. J. (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, 129: 2503–2511.
134. Viérin, M., Bouissou, M. F. (2001). Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiology & Behavior*, 72: 579–587.
135. 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.
136. Virmani, M., Malik, R. K., Singh, P., Dalal, S. S., (2011). Studies on blood biochemical and mineral profiles with the treatment of acyclicity in post-partum anestrus sahiwal cows. *Haryana Veterinarian*, 50: 77-79.
137. Warriss, P. D., Brown, S. N., Knowles, T. G., Kestin, S. C., Edwards, J. E., Dolan, S. K., Phillips, A. J., (1995). Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours. *The Veterinary Record*. 136: 319– 323.

138. Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72: 1063–1081
139. Widman, M., Steen, M. Elofsson, K. (2017). Consequential costs of sheep depredation by large carnivores in Sweden. Swedish University of Agricultural, Working Paper, 2: 1401-4068. Disponible en: https://pub.epsilon.slu.se/14178/7/widman_m_et_al_170327.pdf Fecha de consulta: 05-05-20.