

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**TRATAMIENTO CON PROGESTERONA INYECTABLE INMEDIATAMENTE
ANTES DE LA ESQUILA POSPARTO: EFECTOS SOBRE LA RESPUESTA
DE ESTRÉS EN OVEJAS**

por

Bruna Baptista Estevan
Laura Blanco Núñez



FV-34477



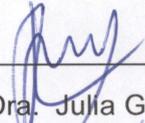
TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias Veterinarias
(Orientación Producción Animal,
Bloque Rumiantes y
Orientación Medicina Veterinaria)
MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2020

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



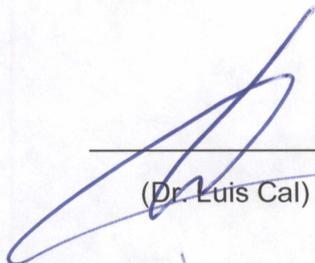
(Dra. Julia Giriboni)

Segundo miembro (Tutor):



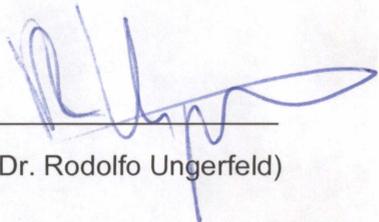
(Dra. Aline Freitas de Melo)

Tercer miembro:



(Dr. Luis Cal)

Cuarto Miembro:



(Dr. Rodolfo Ungerfeld)

Fecha:

14 de diciembre de 2020.

Autores:



(Bruna Baptista Estevan)

(Laura Blanco Núñez)

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido.....	3
Lista de tablas y figuras.....	4
Índice de abreviaturas.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
Agradecimientos generales.....	6
Agradecimientos de Bruna Baptista.....	7
Agradecimientos de Laura Blanco.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
2 Revisión bibliográfica.....	13
2.1 Esquila.....	13
2.2 Concepto de estrés.....	14
2.3 Respuesta al estrés.....	15
2.4 Progesterona (p4) y respuesta de estrés.....	17
3 Hipótesis.....	19
4 Objetivos.....	20
4.1 Objetivos generales.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5 Materiales y métodos.....	21
5.1 Local de estudio, animales y manejo.....	21
5.2 Esquila.....	21
5.3 Análisis estadístico.....	21
6 Resultados.....	23
7 Discusión.....	27
8 Conclusión.....	30
9 Referencias bibliográficas.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Temperatura y Frecuencia cardíaca antes y después de la esquila posparto de ovejas tratadas con 50 mg de progesterona inyectable inmediatamente antes de la misma o en ovejas control.....24

Figura 2. Concentración de glucosa antes y después de la esquila posparto de ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable inmediatamente antes de la misma o en ovejas control.....25

Figura 3. Concentraciones de proteínas totales, albúmina y globulinas antes y después de las esquila posparto de ovejas tratadas con 50 mg de progesterona inyectable inmediatamente antes de la misma o en ovejas control.....26

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotropica

CIDR: dispositivo intravaginal liberador de progesterona

CRH: hormona corticotropina

FC: frecuencia cardíaca

FR: frecuencia respiratoria

FSH: hormona folículo estimulante

GABA_A: ácido gamma-aminobutírico

LH: hormona luteinizante

P4: progesterona

SC: subcutáneo

TAS: test de aislamiento social

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos generales

Queremos agradecerle a Aline, nuestra tutora, por guiarnos, enseñarnos, por su dedicación y apoyo en todo momento.

A nuestro cotutor Rodolfo Ungerfeld por sus aportes y conocimientos. También quisiéramos agradecer a Juan Pablo Damián y al personal del campo experimental Migués por su ayuda en el trabajo de campo.

A las funcionarias de biblioteca por brindarnos su tiempo.

A nuestras familias por apoyarnos siempre a lo largo de la carrera.

Agradecimientos de Bruna Baptista

Quiero agradecerle a Aline, por la paciencia, por motivarnos y estar siempre. A Rodolfo Ungerfeld, por sus minuciosas correcciones que fueron de gran ayuda.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por darme la libertad y la oportunidad de poder elegir esta carrera. Por inculcarme el valor y el respeto hacia los animales, enseñándome a criar desde chica un perrito, un guachito.

A mis abuelas, por acompañarme en los buenos y malos momentos.

A mis tíos que estuvieron cuando los necesité.

A los veterinarios Caio y Carminha que me permitieron trabajar y aprender con ellos.

Agradecimientos de Laura Blanco

Agradezco especialmente a cada integrante de mi familia que a lo largo de esta carrera han sabido demostrarme el valor de la familia con cada acto personal, a mi hermano por muchas veces dejar a un lado sus sueños por ayudarme a cultivar los míos, a mi madre por enseñarme el valor de nunca bajar los brazos por más vicisitudes en el camino, a mi padre por ser un compañero de las hermosas locuras de la carrera y a mi abuela por enseñarme el don de la sabiduría del tiempo.

A mis tutores Aline Freitas-de-Melo por estar en constante contacto inclusive muchas veces dejando a un lado sus propias actividades, a Rodolfo Ungerfeld por mantener siempre calma en momentos de tensión.

Especial agradecimiento a todo el personal de Miguez que siempre con su hermoso trato, cordial, cercano, nos brindaron las herramientas para poder llevar a cabo la tesis.

A las distintas cátedras a las que fuimos a golpear la puerta para intentar saber un poco más.

Y como último agradecimiento y no por menos importante, agradecer a las bibliotecólogas que sin sus herramientas de búsqueda nos hubiera sido imposible desarrollar la tesis.

RESUMEN

En los sistemas de producción ovina se realizan diversas prácticas de manejo que generan estrés y perjudican el bienestar de los animales, como el destete, el transporte y la esquila. Por ello, es importante desarrollar manejos o tratamientos que reduzcan la respuesta de estrés al realizar estos manejos. En este sentido, se ha determinado que el tratamiento con progesterona (P4) inyectable al día del destete disminuye los cambios comportamentales indicadores de estrés en ovejas. El objetivo de esta Tesis fue determinar si el tratamiento con P4 inyectable inmediatamente antes de la esquila posparto reduce la respuesta de estrés en ovejas. El experimento se llevó a cabo en el campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Migues). Se utilizaron 15 ovejas Corriedale multíparas de partos simples y sus corderos. Las ovejas se separaron en dos grupos homogéneos en peso y días posparto: mientras que a 8 ovejas se les administró 50 mg de P4 oleosa sc 1 h antes de la esquila, las otras 7 ovejas quedaron como control, y se les administró la misma cantidad de aceite de girasol. La esquila se realizó a los 55 días posparto, utilizando el método Tally-Hi. Se registró la temperatura rectal y la frecuencia cardíaca de las ovejas antes (tiempo -10 min), inmediatamente después (tiempo 0) de la esquila, y a los 10, 20 y 30 min de realizada la misma. En los mismos tiempos, luego de realizar las medidas de temperatura y de frecuencia cardíaca, se colectó sangre por venopunción de la vena yugular para determinar las concentraciones de proteínas totales, albúmina, globulinas y la glucemia. El tratamiento no afectó ninguna de las variables registradas. Tampoco se observó interacción entre el tratamiento y el tiempo en ninguna de las variables registradas. Sin embargo, la frecuencia cardíaca y la temperatura rectal cambiaron luego de la esquila, independiente del tratamiento aplicado ($P \leq 0,0001$). La frecuencia cardíaca aumentó a los 10 min luego de la esquila ($P \leq 0,0001$), volviendo a los valores iniciales a los 20 min de la misma. La temperatura rectal disminuyó luego de la esquila ($P \leq 0,0001$), volviendo a los valores iniciales a los 10 min de la misma. En conclusión, el tratamiento con P4 inyectable inmediatamente antes de la esquila posparto no redujo la respuesta de estrés.

ABSTRACT

In sheep production systems, animals are subjected to different stressful situations, such as weaning, transport and shearing, which raises concerns about animal welfare. Therefore, it is important to develop treatments or managements to reduce the stress response triggered by those situations. In this sense, it has been reported that oil-based progesterone (P4) injected immediately before abrupt weaning of lambs reduce the behavioural response of ewes to weaning. The aim of this Thesis was to determine if the injection of P4 immediately before shearing postpartum ewes reduces some stress responses. The study was conducted at the Campo Experimental N° 1, of the Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Migues) with 15 multiparous single-lambing Corriedale ewes and their lambs. Ewes were allocated to two homogeneous groups according to their body weight and days postpartum: while 8 ewes were treated with 50 mg of oil-based P4 sc, 1 h before shearing, the other 7 ewes remained as controls, injecting them the same volume of sunflower oil. The shearing was done 55 days postpartum using the Tally-Hi method. Rectal temperature and heart rate of ewes were recorded before (time -10 min), and immediately (time 0) after shearing and at 10, 20, 30 min. In the same times, after recorded the rectal temperature and the heart rate, blood was collected by venipuncture by juglar vein to determine the concentrations of total proteins, albumin, globulins and glycaemia. Treatment did not affect any recorded variable. However, heart rate and rectal temperature changed after shearing independently of the treatment ($P \leq 0.0001$). The heart rate increased 10 min after shearing ($P \leq 0.0001$), returning to the initial values at 20 min. Rectal temperature decreased after shearing ($P \leq 0.0001$), returning to initial values at 10 min. In conclusion, oil-based P4 injected immediately before postpartum shearing did not reduce the stress response.

1. INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción ovina se realizan diversas prácticas de manejo que generan estrés, como el descole, el transporte, la esquila y el destete (Burdick y col., 2010). La esquila es un manejo esencial dentro de la industria lanera, y se define como el proceso mediante el cual se obtiene la producción de lana de un ovino, luego de un determinado periodo de crecimiento (Calvo, 1977). La esquila es una práctica necesaria para el bienestar de los animales ya que permite disminuir el riesgo de estrés calórico (Dominguez, 2013). Sin embargo, esta práctica también genera una respuesta aguda y crónica de estrés. La respuesta aguda de estrés está relacionada a al movimiento de los animales al corral, el ruido de las máquinas de esquilar, la separación del cordero en el caso de la esquila posparto, el entorno desconocido, los movimientos relacionados a la esquila de otros animales, la manipulación e inmovilización durante la esquila y la remoción de forma súbita del vellón de la oveja (Hargreaves y col., 1989; Aleksiev, 2009). Existen dos periodos en los que es más frecuente realizar la esquila: la esquila preparto y la posparto. La esquila preparto se ha ido incorporando paulatinamente entre los criadores de lanares porque reduce la mortalidad de corderos, particularmente en las primeras 72 horas de vida, prolongándose este efecto hasta el destete con respecto a la de corderos nacidos de ovejas que no han sido esquiladas (Banchero y col. 2007). La mayor supervivencia de corderos se explica en parte por el mayor peso vivo de los corderos al nacimiento. Algunas ventajas de la esquila posparto en comparación a la esquila preparto suponen el menor riesgo de pérdidas de animales por toxemia de la preñez, y una menor probabilidad de abortos (Ensminger, 1973).

El estrés es la respuesta orgánica de un individuo con el objetivo de restablecer su homeostasis (Johnson y col., 1992; Moberg, 2000). Los estímulos que desequilibran la homeostasis del individuo son denominados estresores (Johnson y col., 1992; Moberg, 2000; Pacák y Palkovits, 2001). Una vez que el organismo es afectado por un estresor, este genera una respuesta en forma de cascada de reacciones biológicas (Moberg, 2000) que intentan restablecer la homeostasis (Pacák y Palkovits, 2001). La respuesta de estrés comprende cambios a niveles fisiológicos y comportamentales (Trainor, 2011) que pueden ser medidos, y por ello sirven como indicadores de estrés. Por ejemplo, el aumento de la frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR), el aumento de la temperatura rectal, cambios comportamentales (aumento del número de vocalizaciones y micciones) y alteraciones en los parámetros bioquímicos (como cambios en las concentraciones de proteínas séricas totales, cortisol, albúmina y globulinas). Uno de los indicadores de estrés más utilizados en ovinos es la variación en las concentraciones de glucocorticoides (Griffin, 1989). Se ha visto que la respuesta de estrés genera un aumento del cortisol (Carcangiu y col., 2008; Moberg, 2000) y éste puede ser medido en plasma o suero sanguíneo, orina, saliva (Cockrem, 2013; Mormède, 2007), heces, leche y pelo (Mormède, 2007), siendo la medición en plasma o suero sanguíneo la más empleada (Cockram, 1996; Mormède, 2007).

La concentración de esteroides sexuales puede afectar la respuesta de los animales a diferentes estresores (Dallman y col., 2002; Freitas-de-Melo y col., 2016a; Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016a). Existen reportes que demuestran

que la progesterona (P4) tiene efectos ansiolíticos y moduladores de la respuesta de estrés en mamíferos (Auger y col., 2008; Freitas-de-Melo y col., 2013; Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016a; Freitas-de-Melo y col., 2019). La P4 ejerce una acción ansiolítica potente, que se atribuye a sus metabolitos neuroactivos (allopregnanolona y pregnanolona). Los resultados obtenidos por Freitas-de-Melo y col. (2013) muestran que el tratamiento con P4 de larga duración aplicado a partir de un dispositivo intravaginal (CIDR) reduce las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés al destete abrupto en ovejas. El tratamiento con P4 inyectable inmediatamente antes del destete reduce las respuestas comportamentales y fisiológicas indicadoras de estrés en ovejas en anestro (Aramburu y col., 2016). Por tanto, en esta Tesis, dados los posibles efectos de la P4 sobre la respuesta de estrés, se evaluó si la administración de P4 inyectable disminuye la respuesta aguda de estrés luego de la esquila posparto. Estudiar si la P4 inyectable afecta la respuesta de estrés luego de la esquila posparto, es de interés para la producción ovina, ya que la esquila es una práctica estresante, pero es necesaria desde el punto de vista productivo y del bienestar animal.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Esquila

La esquila es una de las actividades más frecuentes en el rubro ovino, siendo utilizada para cosechar uno de los productos más importantes desde el punto de vista económico, la lana. En el 2017 se estimó que Uruguay produjo 25.672 toneladas de lana de varios tipos con un valor aproximado de 197 millones de dólares (Bervejillo y Bottaro, 2017). Se define a la esquila como el proceso mediante el cual se obtiene la producción de lana de un ovino, luego de transcurrir un determinado periodo de crecimiento (Calvo, 1977). La esquila es necesaria para mejorar el bienestar del animal, ya que las ovejas domésticas no mudan su lana de forma natural (Glenn y col, 1996). En ovejas, la esquila se realiza normalmente de forma anual, pero el momento de elección de la esquila es altamente variable según factores climáticos, sanitarios, productivos y económicos (Ensminger, 1973). Debido a los cambios en el manejo y resistencias genéticas a la miasis, el momento de la esquila actualmente puede definirse de forma más flexible (Bell, 2010). Algunas ventajas de la esquila posparto en relación a la esquila preparto incluyen el menor riesgo de pérdidas de animales por toxemia de la preñez, y una menor probabilidad de abortos (Ensminger, 1973). Por otra parte, en Uruguay, desde el año 2000 se busca implementar la esquila preparto, entre los días 60 y 90 de gestación. La esquila preparto, además de facilitar el manejo de los vientres durante el periodo de partos, permite reducir significativamente la mortalidad de corderos, particularmente en las primeras 72 h de vida, prolongándose este efecto hasta el destete con respecto a la de corderos nacidos de ovejas que no han sido esquiladas. La mayor supervivencia de los corderos nacidos de ovejas esquiladas durante la gestación se explica principalmente por el mayor peso vivo al nacimiento (Banchemo y col., 2007). Estos autores también mencionan que la esquila preparto aumenta la duración de la gestación entre 1,2 y 1,8 días. Se han reportado otras ventajas de la esquila preparto, como un aumento de la producción de leche, y de la cantidad de sólidos totales, ya que la leche presenta una mayor cantidad de proteína y grasa (Nedkvitne, 1972; Cam y Kuran, 2004). El mejor aporte nutricional de esta leche deriva en corderos con mayor crecimiento durante la lactación, y por lo tanto mayores supervivencia y peso al destete. Se ha demostrado que las ovejas recién esquiladas son más propensas a utilizar refugio durante el parto (Lynch y Alexander, 1980). Este comportamiento también contribuiría en aumentar la supervivencia de los corderos recién nacidos. Asimismo, la esquila preparto determina un incremento en el consumo de materia seca de las ovejas gestantes, mejorando su condición corporal y determinando un mayor peso al nacimiento de los corderos (Cueto y col., 1996).

El método de esquila más utilizado en Uruguay es el Tally-Hi, que consiste en colocar al animal sentado con los miembros sueltos, sin ningún tipo de ataduras (Moraes, 2003). Se requiere personal capacitado, máquina para esquilar y/o tijeras afiladas (SUL, 2011). Se comienza la esquila por la zona del pecho, continuando por la barriga recorriendo todo el cuerpo para terminar en la zona de la cabeza. Este método permite esquilar al animal con menor esfuerzo y con una mejor interacción humano-animal. También se obtiene una lana de mejor

calidad, ya que no se maneja al animal (Manual de la esquila Tally-hi, 2006). El operador debe tener experiencia para aplicar este método, y saber manipular al animal, ya que este está totalmente suelto, no se rompe la hebra. La posición con la que se trabaja genera menos estrés y calambre en el animal que con el método tradicional o criolla (Cesa, 2008). Esta técnica considera el bienestar de los animales, mejora el sucesivo tratamiento de la lana y resulta en vellones más atractivos para la industria (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 2017).

La esquila es una de las prácticas más estresantes en la producción ovina (Fulkerson, 1982; Hargreaves and Huston, 1989), generando respuestas agudas y crónicas indicadoras de estrés. El manejo vinculado a la esquila, como la separación temporaria del cordero (en el caso de la esquila posparto), el movimiento de los animales, los ruidos y los movimientos relacionados a la esquila de otros animales, la manipulación e inmovilización durante la esquila y la remoción de forma súbita del vellón de la oveja provocan una importante respuesta de estrés (Hargreaves y col., 1989; Aleksiev, 2009). Por lo tanto, la esquila modifica de forma considerable los parámetros fisiológicos y comportamentales de la oveja (Hargreaves y Hudson, 1889; Ungerfeld y col., 2018). Más específicamente, en el caso de la esquila en el posparto se agrega otro factor estresante, que es la separación madre-cría. Luego de la esquila se observa un aumento en el tiempo dedicado al pastoreo (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019). Durante los dos primeros días después de la esquila, las ovejas están más dispersas, probablemente debido a las dificultades para reconocer a sus compañeras (Ungerfeld y col., 2018). La esquila desencadena aumentos importantes en las concentraciones de cortisol (Jephcott y col., 1987; Sanger y col., 2011), y en la glucemia (Carcangiu y col., 2008). Tanto la esquila como el manejo relacionado a la misma dan como resultado una elevación a corto plazo del cortisol plasmático (Jephcott y col., 1987; Hargreaves y Hutson 1989). También se ha reportado que la esquila genera cambios en las concentraciones de las proteínas totales, albúmina y globulinas (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019).

2.2. Concepto de estrés

El estrés generalmente se ha concebido como una reacción que refleja lo que ocurre cuando los animales están expuestos a efectos adversos, que tienen como consecuencia molestia o incluso la muerte de los mismos (Dantzer y Mormede, 1983). El estrés es la respuesta orgánica de un individuo a un estímulo que amenaza la homeostasis (Johnson y col., 1992; Moberg, 2000), entendiéndose por homeostasis los mecanismos fisiológicos coordinados que mantienen en equilibrio al organismo (Cannon, 1929). Los estímulos que desequilibran la homeostasis y por ende generan estrés son denominados estresores (Johnson y col., 1992; Moberg, 2000; Pacák y Palkovits, 2001). El término estrés se refiere al efecto de estímulos adversos que perturban gravemente la homeostasis (Gómez y Escobar, 2006). 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 de estrés que produzca cambios deletéreos en el estado biológico del animal (distrés) (Moberg, 2000).

Para Pacak y Palkovist (2001) los estresores pueden ser agrupados en cuatro grandes categorías: 1) físicos (frío, calor, radiación intensa, ruido y vibración); 2) psicológicos (afectan el proceso emocional, resultando en ansiedad, miedo o frustración); 3) sociales (agresión, dominancia, aislamiento del grupo e interacción adversa con el humano); y 4) metabólicos (ejercicio físico, hemorragia, hipoglucemia). Además, según la duración del estresor, los mismos pueden ser clasificados en agudos y crónicos (Pacák y Palkovits, 2001). El estrés agudo es aquel que se produce ante la presencia de un desafío que obliga al animal a adaptarse en un corto plazo de tiempo por medio de una respuesta fisiológica y comportamental. El ejemplo más común en los animales de producción es el descole, considerado un evento estresante y/o doloroso. El estrés crónico consiste en la exposición continua o repetida a los mismos estresores agudos, etapa en la cual el sistema nervioso autónomo rara vez tiene la oportunidad de activar la respuesta de relajación (Romero Peñuela y col., 2011). Además, la magnitud de la respuesta de estrés depende de la severidad del estresor, la intensidad con que el mismo afecta al individuo, la duración de dicho estímulo y si el animal es capaz de eludirlo (Griffin, 1989).

2.3. Respuesta al estrés

Los animales responden a un estímulo estresante con cambios comportamentales, fisiológicos y endócrinos. 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). Según Mormède y col. (2007), el bienestar del animal se refiere al estado psicológico subjetivo del individuo, en relación con el medio interno y externo. El estrés debido a las medidas de manejo puede afectar la eficiencia productiva y reproductiva (Dobson y Smith, 2000). Los procedimientos habituales de manejo en la cría de ovinos, como el transporte, tratamientos podales, tratamientos farmacológicos, esquila, aislamiento, captura, etc, inducen una respuesta endócrina y metabólica en el animal (Baldock y Sibly, 1990; Hargreaves y Hutson, 1989). La reacción a los factores de estrés mencionados anteriormente se centra principalmente en la activación del sistema simpático y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal a través de la producción de catecolaminas y glucocorticoides (Miller y O'Callaghan, 2002). Estas hormonas alertan a los animales, generando la capacidad de reaccionar a los estímulos ambientales para preservar la homeostasis orgánica (Herman y Cullian, 1997).

La respuesta neuroendócrina comienza con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal: el hipotálamo libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina, las que estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) por parte de la adenohipófisis (Matteri, 2000). La ACTH es liberada al torrente sanguíneo para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides desde la corteza adrenal, siendo el cortisol el principal glucocorticoide en los ovinos (Mormède y col., 2007). Simultáneamente, se estimula la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) desde la médula adrenal (Trevisi y Bertoni, 2009). El cortisol aumenta la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en

glucosa, y también aumenta la movilización de los aminoácidos desde el músculo (Muchenje y col., 2009). En esta compleja respuesta fisiológica se presenta un proceso de retroalimentación negativa, en el cual el cortisol actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis disminuyendo la producción de CRH y ACTH (Griffin, 1989). El cortisol también reduce la entrada de glucosa a las células, aumentando la concentración de glucosa e insulina en sangre (Tempel and Leibowitz 1994). La hiperglucemia inducida por estrés tiene varios componentes e implica principalmente una sinergia entre glucagón, catecolaminas y glucocorticoides (Eigler y col., 1979). La concentración de glucosa en sangre también se ha utilizado como indicador de estrés, ya que el estrés aumenta el cortisol y como consecuencia la glucemia. Por otro lado, el cortisol aumenta la disponibilidad de energía y las concentraciones de glucosa en la sangre porque estimula la proteólisis, lipólisis y la gluconeogénesis en el hígado (Romero Peñuela y col., 2011). Se ha observado por ejemplo un aumento de la glucemia en ovejas luego del aislamiento social (Al-Qarawi y Badreldin, 2005).

Los cambios en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas también son considerados como indicadores de estrés en rumiantes (Apple y col., 1993). En novillos y toros se observa un aumento de las proteínas totales, albúmina y globulinas luego del transporte (Galyean y col., 1981). Asimismo, en vacas, ovejas y corderos las concentraciones de proteínas totales y la de albúmina cambian luego del destete (Ungerfeld y col., 2011; Freitas-de-Melo y col., 2013; 2017). En ovinos, el aumento en la FC (Von Borrel y col. 2007), FR y temperatura corporal también son usados para determinar tanto la presencia de la respuesta de estrés como su magnitud. De acuerdo con Rushen (2000), los cambios comportamentales se manifiestan rápidamente y son fáciles de observar y medir, como por ejemplo una reducción en el tiempo de descanso y alimentación (pastando y rumiando), y un aumento en la locomoción (Orgeur y col., 1998; Damián y col., 2013; Freitas-de-Melo y col., 2013).

Existen numerosas respuestas endócrinas (hormonales) durante el estrés. Estas respuestas dan lugar a manifestaciones fisiológicas y/o conductuales que tienen efectos positivos o negativos en el bienestar de los animales (Tilbrook y Ralph, 2018). El bienestar de los animales fue definido por el comité Brambell como un término que abarca el bienestar físico y mental de los animales (Brambell y col., 1965). Los aumentos de las hormonas del estrés no siempre significan que el bienestar esté afectado, las respuestas de estrés también son vitales (Ralph y Tilbrook 2016). Sin embargo, el cortisol plasmático crónicamente elevado no siempre está asociado con la función fisiológica deteriorado como se ha demostrado en ovejas (Wagenmaker y col., 2010).

2.4. Progesterona y respuesta de estrés

La P4 es una hormona esteroidea producida tanto en machos como en hembras. La P4 se sintetiza a partir de pregnenolona, un derivado del colesterol (Strauss, 2018; Schumacher y col., 2007). Además de su papel en la reproducción, la P4 modulan una variedad de trastornos y emociones, tales como depresión

ansiedad, irritabilidad y miedo (Brot y col., 1995; Hiroi y Neumaier, 2006; Auger y Forbes-Lorman, 2008). La P4, a partir de algunos metabolitos neuroactivos (allopregnanolona y pregnanolona) disminuye la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y en consecuencia la producción de glucocorticoides y los cambios fisiológicos y comportamentales que acompañan el aumento del mismo (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). La P4 ejerce una acción ansiolítica potente, ya que la allopregnanolona actúa como modulador alostérico positivo de los receptores GABAA, generando un efecto inhibitorio en el sistema nervioso central en mamíferos (Bitran y col., 1993; Auger y col., 2008; Freitas-de-Melo y col., 2013; Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). En este sentido, la administración intranasal de P4 disminuye la ansiedad en ratones (Ducharme y col., 2010). También se ha reportado que la P4 exógena modifica la respuesta de estrés en ovejas al destete, éstas presentaron menores respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés al destete, (Freitas-de-Melo y col., 2013) y al aislamiento social. Se observó un aumento de las concentraciones de P4 después del aislamiento social, la disminución de las concentraciones de P4 aumenta la sensibilidad del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal a los factores estresantes (Freitas-de-Melo y col., 2016). Se ha reportado en roedores y en ovinos que la suspensión del tratamiento con P4 aumenta la ansiedad al disminuir el efecto inhibitorio de esta hormona sobre el receptor GABAA (Smith y col., 2007; Freitas-de-Melo y col., 2016), lo que lleva al animal a ser más susceptible al estímulo ambiental. En ratas las concentraciones de glucocorticoides inducidas por estrés son más altas en hembras que en machos en respuesta a diferentes estresores (Handa y col., 1994; Jezova y col., 1996). Según Turner y col. (2002), las ovejas y los carneros respondieron de diferente manera a los diferentes factores estresores, los carneros tuvieron una mayor respuesta de cortisol a la hipoglucemia inducida por insulina, las ovejas tuvieron una mayor respuesta de cortisol a los estresores físicos, psicológicos de aislamiento y de restricción. Esta diferencia relacionada al sexo puede estar explicada por los esteroides sexuales predominantes en cada sexo. También se ha reportado que las ovejas en fase luteal tendieron a presentar una menor respuesta comportamental de estrés al aislamiento social que ovejas en celo (Alzugaray y Sánchez, 2020). Dado que las ovejas en fase luteal tendieron a presentar menores cambios comportamentales (mayor número de vocalizaciones e inmovilizaciones) durante el aislamiento social que las ovejas en fase luteal. Además, las ovejas gestando (que por lo tanto presentan concentraciones elevadas de P4) presentan menor secreción de cortisol y cambios comportamentales luego de la esquila que las ovejas vacías (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019). Según los mismos autores, las ovejas preñadas tenían menor concentración de cortisol que las ovejas vacías. La respuesta del cortisol fue mayor en las ovejas no preñadas que en las preñadas, lo que refleja que el manejo general fue más estresante para estas ovejas.

En roedores se demostró que el tratamiento con P4 disminuye la respuesta de estrés o ansiedad (Barbaccia y col., 2001). Según Heinsbroek y col. (1988), la inyección subcutánea de P4 reduce el comportamiento depresivo en ratones, y la ansiedad en meriones (Starkey y Bridges, 2010). Más específicamente en ovinos, el tratamiento con P4 inyectable inmediatamente antes del destete reduce las respuestas comportamentales indicadoras de estrés en ovejas en

anestro (Aramburu y col., 2016). Asimismo, Freitas-de-Melo y col. (2013) demostraron que el tratamiento de larga duración con P4 mediante un CIDR reduce las respuestas fisiológicas y comportamentales indicadoras de estrés en la oveja al destete abrupto. Destetar los corderos causó una reducción en la concentración de proteínas totales y globulinas en las ovejas, respuestas que también fueron reducidas por el tratamiento con P4 (Freitas-de-Melo y col., 2013). Freitas-de-Melo y col. (2019) determinaron que un día después de insertar CIDRs, la distancia de fuga fue más corta en las vaquillonas tratadas con CIDR que en las no tratadas. Las vaquillonas previamente tratadas con P4 tendieron a tener una mayor distancia de fuga que las vaquillonas del grupo control lo que indicaría menor reactividad.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento con P4 inyectable antes de la esquila posparto disminuye la respuesta aguda de estrés en ovejas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

Determinar si la aplicación de una dosis única de P4 antes de la esquila posparto disminuye la respuesta aguda de estrés en ovejas.

4.2 Objetivos específicos

Determinar si la aplicación de una dosis única de P4 inyectable antes de la esquila posparto disminuye los cambios en:

- la temperatura rectal y en la FC;
- las concentraciones de glucosa, proteínas totales, albúmina y globulinas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Local de estudio, animales y manejo

El trabajo se realizó en el Campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria (Migues, situado en el noreste del Departamento de Canelones, sobre la ruta 108 en el km 12). Durante todo el experimento los animales se encontraban en un potrero de campo natural con libre acceso al agua. Para el estudio se utilizaron 15 ovejas Corriedale multíparas de partos simples y sus corderos. Se realizó el control de partos mediante dos recorridas, una en la mañana y otra en la tarde, registrando la fecha de parto, colocando caravana, pesando e identificando el sexo de los corderos. Las ovejas se separaron en dos grupos homogéneos según el peso (grupo control: $50,8 \pm 5,3$ kg y grupo tratado: $52,8 \pm 4,0$) y los días posparto (de 52 a 63 días). Mientras que a 8 ovejas se les administró P4 oleosa, sc en la zona subescapular (50 mg en base oleosa, MAD-4, Laboratorio Río de Janeiro, Argentina) 1 h antes de la esquila, a las otras 7 ovejas se les administró el mismo volumen de aceite de girasol (1,0 mL, sc, en la zona subescapular) como control.

5.2 Esquila y registros

La esquila se realizó a los 57 días posparto por el método Tally-Hi. Para minimizar el estrés de separación de las ovejas y sus crías, se mantuvieron las mismas juntas de sus crías antes y después de la esquila. Se registró la temperatura rectal (utilizando termómetros digitales) y la FC (mediante auscultación de la zona cardíaca durante 15 s) de las ovejas, antes (tiempo -10 min), inmediatamente después (tiempo 0) de la esquila, y a los 10, 20, y 30 min posteriores.

Luego de realizar las medidas de temperatura y de FC se realizó la extracción de sangre por venopunción de la vena yugular. Las muestras fueron colectadas en tubos secos (sin anticoagulante) y tubos con heparina e iodoacetato (Eurotubo, Deltalab, Rubi, España) y centrifugadas durante 10 min a 1500 g. El suero y plasma obtenidos se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su posterior análisis. Los análisis de sangre se realizaron en el Departamento de Biociencias Veterinarias de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. La concentración de glucosa en las muestras de plasma se determinó por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (BioSystems, Barcelona, España). La concentración de proteínas totales y albúmina de los sueros colectados se determinaron por la técnica de Biuret y por un kit comercial (Bio-Systems, Barcelona, España), respectivamente. La concentración de globulinas se estimó por la diferencia entre las concentraciones de proteínas totales y albúmina (Säkkinen y col., 2005).

5.3 Análisis estadístico

La normalidad de cada variable fue testada con el test de Shapiro–Wilk. Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS (SAS 9.0V; SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Las variables fueron analizadas como medidas

repetidas (procedimiento MIXED). El modelo incluyó como efectos fijos el tratamiento, el tiempo y la interacción entre el tratamiento y el tiempo. Además, se incluyó a la oveja como efecto aleatorio. Los efectos se consideraron significativos cuando $P \leq 0,05$, y se consideró como tendencia estadística cuando $0,05 < P < 0,1$. Los datos se presentan como medias ajustadas \pm error estándar de la media.

6. RESULTADOS

6.1 Frecuencia cardíaca y temperatura rectal

La FC y la temperatura rectal cambiaron a lo largo del tiempo (Figura 1A y 1B). La FC aumentó a los 10 min luego de la esquila ($P \leq 0,0001$), volviendo a los valores iniciales a los 20 min de la misma. La temperatura rectal disminuyó luego de la esquila ($P \leq 0,0001$), volviendo a los valores iniciales a los 10 min de la misma (Figura 1A). Sin embargo, no se observaron efectos del tratamiento con P4, ni interacción entre el tratamiento y el tiempo en estas variables.

6.2 Proteínas totales, albúmina, globulinas y glucemia

No hubo efecto del tiempo, del tratamiento, ni de la interacción entre el tratamiento y el tiempo en las concentraciones de proteínas totales, albúmina, globulinas y glucosa en sangre. Dichas variables se muestran en las Figuras (2 y 3A, 3B y 3C).

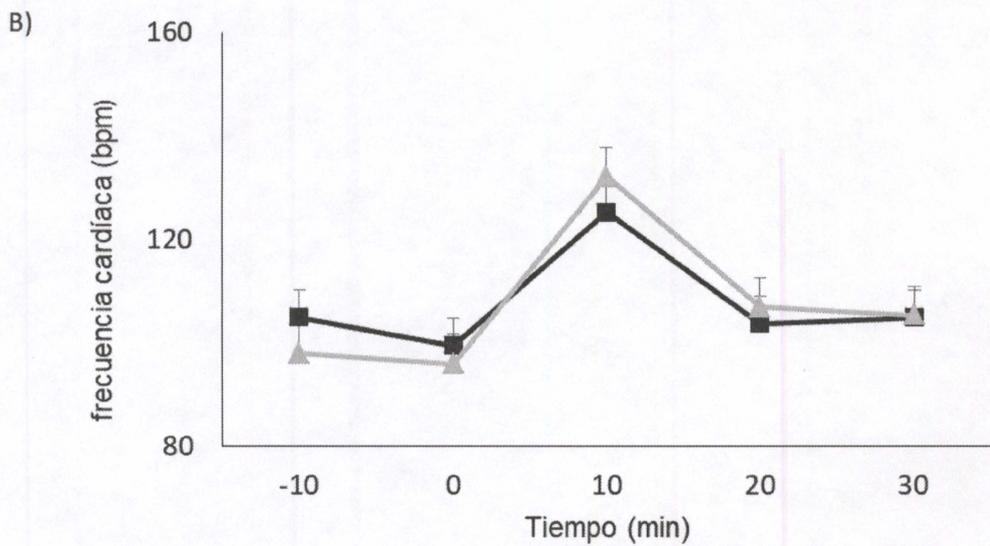
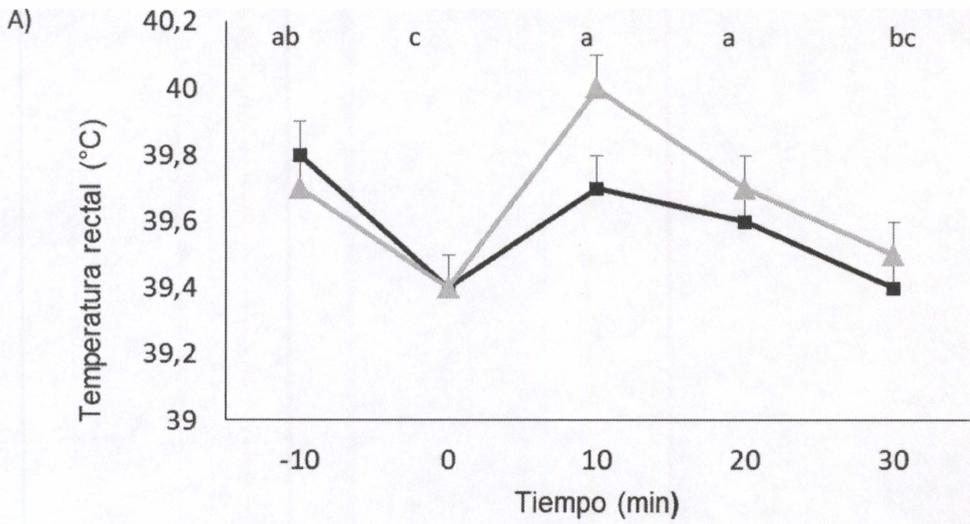


Figura 1. Temperatura rectal (A) y frecuencia cardíaca (B) antes y después de la esquila en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable (▲) aplicada 1 h antes de la esquila posparto (Tiempo 0) y en ovejas control (■). Letras diferentes indican diferencias en el tiempo ($P < 0,0001$). La esquila fue realizada a los 57 días posparto.



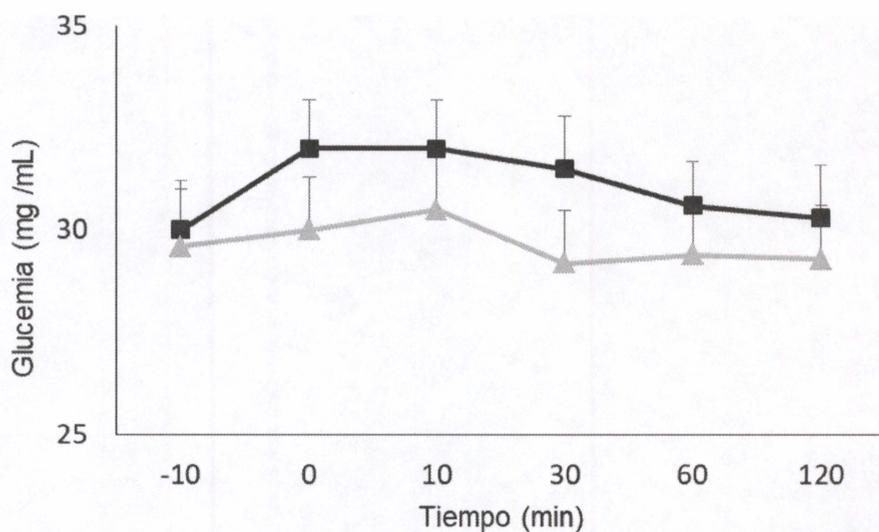


Figura 2. Glucemia antes y después de la esquila en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable (▲) aplicada 1 h antes de la esquila posparto (Tiempo 0) y en ovejas control (■). Letras diferentes indican diferencias en el tiempo ($P < 0,0001$). La esquila fue realizada a los 57 días posparto.

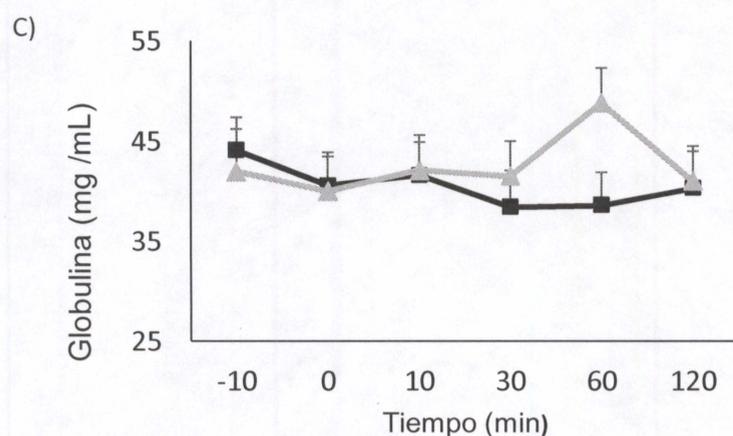
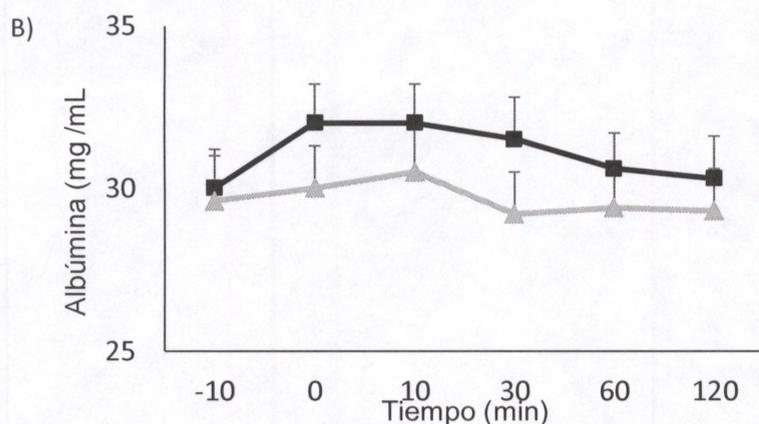
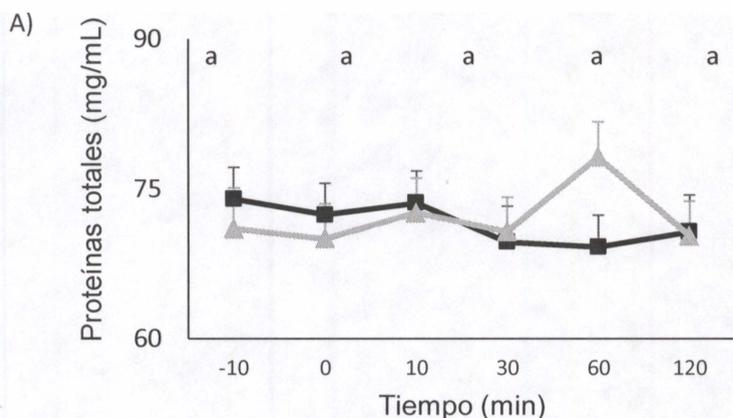


Figura 3. Concentraciones de proteínas totales (A), albúmina (B) y globulinas (C) antes y después de la esquila posparto (Tiempo 0) en ovejas tratadas con 50 mg de P4 inyectable (—▲—) aplicada 1 h antes de la esquila y en ovejas que quedaron como control (—■—). Letras diferentes indican diferencias en el tiempo. La esquila fue realizada a los 57 días posparto.

7. DISCUSIÓN

El tratamiento con P4 inyectable aplicado una hora antes de la esquila posparto no disminuyó la respuesta aguda de estrés medida a partir de los indicadores de estrés considerados en este trabajo. Estos resultados difieren de estudios previos realizados por Aramburu y col. (2016), quienes reportaron que el mismo tratamiento con P4 inyectable de larga acción aplicado inmediatamente antes del destete artificial disminuye la respuesta comportamental indicadora de estrés en ovejas en anestro. En dicho trabajo, las ovejas disminuyeron el tiempo en que estuvieron paradas el día del destete, y caminaron y costearon menos demostrando menor inquietud. Sin embargo, en coincidencia con los resultados de la presente Tesis estos autores no encontraron efectos del tratamiento en la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas. En el mismo sentido, Freitas-de-Melo y col. (2013) demostraron que un tratamiento de 32 días con dispositivos intravaginales liberadores de P4 reduce la frecuencia de vocalizaciones y de costeo al destete artificial en ovejas. Además, estos mismos autores reportaron que el tratamiento con P4 determina una menor disminución en las concentraciones de globulinas y evita la disminución en las concentraciones de proteínas totales a los 4 días posteriores al destete. Una posible explicación para la diferencia en el resultado esta Tesis es que la esquila no fuera un estresor tan intenso como el destete. Si bien la esquila genera cambios agudos indicadores de estrés en ovejas vacías y gestantes, (Hargreaves y col., 1989; Aleksiev, 2009), en nuestro trabajo solamente la temperatura rectal y la FC cambiaron luego de la esquila posparto. Esto puede sugerir que el estrés generado por la esquila fue poco importante para estas ovejas. La intensidad de la respuesta de estrés de las ovejas pudo estar relacionada con la etapa fisiológica de las mismas. En este sentido, se ha demostrado que la respuesta de estrés en ovejas lactantes es menor probablemente debido a las altas concentraciones de oxitocina que es una hormona que posee un efecto protector, antiestrés (Cook, 1997). Por tanto, es posible que para detectar diferencias en las respuestas indicadoras de estrés según el tratamiento aplicado, el efecto de la P4 debería ser muy importante y/o el estresor utilizado debería ser más intenso.

En ovinos, el aumento en la FC, FR y temperatura son utilizados para establecer presencia de la respuesta de estrés (Von Borrel y col., 2007). En ovejas ocurre un aumento de la FC y de la temperatura después del test de aislamiento social (TAS) (da Costa y col., 2004; Pedernera-Romano y col., 2010), y en carneros se genera un aumento de la FR durante la electroeyaculación (Damián y Ungerfeld, 2011). La temperatura rectal normal en el ovino oscila entre 38,5 °C y 39,9 °C, con un promedio de 39,1 °C (Cunningham, 2008), por lo que si bien hubo una variación de la temperatura rectal con la esquila, los valores se mantuvieron dentro del rango normal (valor mínimo: 39,4 °C y valor máximo: 40 °C). En este sentido, estas respuestas reafirman que al menos en las condiciones de este trabajo, la esquila posparto no fue percibida como un estresor intenso, lo cual también puede ser debido a las condiciones de manejo. Las ovejas fueron movidas de manera lenta y sin perros, descansaron en el corral con sus corderos antes de la esquila, sin encierros prolongados, y el cordero fue separado solamente durante el momento de la esquila. Además, se esquilieron pocos

animales por lo cual los ruidos y los movimientos relacionados a la esquila fueron mínimos. Igualmente, las ovejas ya habían sido esquiladas en los años anteriores, lo que puede implicar que las mismas estuviesen al menos parcialmente habituadas al manejo. En este sentido, la exposición repetida de los animales a una misma situación de estrés puede llevar a una reducción de algunas de las respuestas conductuales y fisiológicas frente a la misma situación estresante, fenómeno que se denomina adaptación o habituación (Rabasa 2011). Por ejemplo, se investigó la exposición repetida a la manipulación como un método para disminuir la respuesta de estrés a la esquila. En ovejas expuestas a esquila falsa (un procedimiento en el que no se quita la lana, pero que por lo demás se parece a la misma) en cuatro ocasiones a intervalos de dos semanas, la respuesta máxima de cortisol no se afectó, pero las concentraciones de cortisol en plasma disminuyeron más rápidamente a concentraciones iniciales más bajas después de cuatro exposiciones. Las distancias de fuga de las ovejas con esquila falsa fueron significativamente más cortas que las de las ovejas control después de las cuatro exposiciones. La respuesta al estrés al cizallamiento simulado se redujo solo ligeramente por repetición (Hargreaves and Hutson, 1990). En el mismo sentido, un indicador de aversión es el tiempo que se necesita para inducir a un animal a reingresar a una manga en la que ya ha sido manejado (Rusher, 1986a y 1986b, 1995). Rushen (1996) advierte que, para medir con precisión la aversión dentro de una manga, el animal debe experimentar más de una vez el procedimiento causante de aversión, por ejemplo trabajos con picanas. Asimismo, en los trabajos en que se determinó un efecto positivo de la P4 sobre la respuesta de estrés durante manejos estresantes (Freitas-de-Melo y col., 2013; Aramburu y col., 2016), la evaluación de los indicadores de estrés se extendió durante los 2 a 4 días posteriores a la aplicación del estresor. Por tanto, hubiera sido interesante haber evaluado los cambios comportamentales y fisiológicos en los momentos posteriores a la esquila, ya que la P4 inyectable alcanza niveles máximos 1 h después del tratamiento en vacas (Martínez-Barbitta y col., 2014), manteniéndose en concentraciones luteales en sangre hasta 16 h de aplicada la misma en ovejas (Freitas-de-Melo y col., datos no publicados).

También hubiera sido interesante haber determinado lo que ocurriría con otros indicadores de estrés agudo, como el cortisol, un indicador clásico de estrés (Rhind y col., 1998), con el objetivo de aumentar la gama de formas de evaluar el estrés agudo. Por ejemplo, el cortisol fue un indicador adecuado para diferenciar la respuesta aguda de estrés entre ovejas preñadas o no preñadas luego de la esquila (Ungerfeld y Freitas de Melo, 2019). El registro de la temperatura superficial en diferentes zonas corporales con el uso de termografía también podría haber sido un buen indicador de estrés, ya que es un procedimiento rápido, no invasivo, no requiere manipulaciones agresivas que de por sí mismas generen respuestas de estrés, manifestando su utilidad en el estudio del comportamiento y bienestar animal (Trueba y col., 2019). Igualmente se podría haber evaluado otros indicadores de estrés como la reducción en el tiempo de descanso, reducción en el tiempo de rumia y en el incremento de la frecuencia de vocalizaciones (Orgeur y col., 1998) luego de la esquila. Por tanto, con el objetivo de mejorar el bienestar animal, sería interesante desarrollar

estrategias de manejo o tratamientos para reducir la respuesta de estrés luego de la esquila.

8. CONCLUSIÓN

El tratamiento con P4 inyectable antes de la esquila posparto en ovejas no modificó las respuestas agudas de estrés registradas en el presente trabajo. La esquila posparto aumentó la temperatura rectal y la frecuencia cardíaca, pero no generó efectos en las concentraciones de proteínas totales, albumina, globulinas y glucosa sanguínea en ovejas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aleksiev Y (2009). The effect of shearing on the behaviour of some physiological responses in lactating Plevan Blackhead ewes. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 15: 446-452.
2. Alzugaray P y Sánchez B (2020). Etapa del ciclo estral y respuesta al aislamiento social en ovejas. Tesis de Grado. Universidad de la República, Uruguay.
3. 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 Animal Science*; 71:71-77.
4. Al-Qarawi AA, Badreldin HA (2005). Isolation stress in desert sheep and goats and the influence of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Vet res Commun* 29:81-90.
5. Auger CJ, Forbes-Lorman RM (2008). Progesterin receptor-mediated reduction of anxiety-like behavior in male rats. *Plos One* 3:11.
6. Aramburu JC, Brit JI, Castells F (2016). Efectos del tratamiento con progesterona inyectable en el momento del destete sobre la respuesta de estrés de ovejas en anestro. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Udelar, 33 p.
7. Baldock NM, Sibly RM (1990). Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 15–39.
8. Banchemo G, De Barbieri I, Montossi F, Quintans G (2007). Esquila preparto: una tecnología para mejorar la supervivencia de corderos: *Revista INIA N°12*.
9. Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G (2001). Stress and neuroactive steroids. *International Review of Neurobiology* 46, 243–272.
10. Bell KJ (2010). Sheep Management. En: D.J. Cottle (ed.) *International Sheep and Wool Handbook*. Ch. 17 (p. 407-423). Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press.
11. Bervejillo J, Bottaro P (2017). Cadena ovina: situación y perspectivas. En: *Anuario OPYPA 2017*. 85-99.
12. Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK (1993). Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA_A receptor function. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*; 45:423-428.
13. Brambell FWR (1965). Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals kept under intensive Livestock Husbandry Systems. London: Ed. Her Majesty's Stationary Office.

14. Brot MD, Koob GF, Britton KT (1995). Anxiolytic effects of steroid hormones during the estrous cycle. Interactions with ethanol. *Recent Dev Alcohol*; 12:243–259.
15. Burdick NC, Carroll JA, Hulbert LE, Dailey JW, Willard ST, Vann RC, Welsh THJr, Randel RD (2010). Relationships between temperament and transportation with rectal temperature and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. *Livestock Science* 129:166–172.
16. Cam MA, Kuran M (2004). Shearing Pregnant Ewes to Improve Lamb Birth Weight Increases Milk Yield of Ewes and Lamb Weaning Weight. *Anima IScience*.17: 1669-1673.
17. Calvo CA (1977). *Ovinos*. Buenos Aires, Editorial H.B., V.2.
18. Cannon WB (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*; 9: 399-431.
19. Carcangiu V, Vacca GM, Parmeggiani A, Mura MC, Pazzola M, Dettori ML y Bini PP (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. Cesa A (2008). *Pequeños rumiantes*, Facultad de Agronomía, UBA, p. 21.
21. Cockram MS, Kent JE, Goddard PJ, Waran NK, McGlip IM, Jackson RE, Muwanga M, Prytherch S (1996). Effect of space allowance during transport on the behavioural and physiological responses of lambs during and after transport. *Animal Science* 62:461-477.
22. Cockrem JF (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology* 181:45-58.
23. Cook C (1997). Oxytocin and prolactin suppress cortisol responses to acute stress in both lactating and non-lactating sheep. *Journal Dairy Research* 64, 327—339.
24. Cueto M, Gibbons A, Giraud C, Somlo A, Taddeo H (1996). Effect of feeding level and pre-lambing shearing on lambs birth weight and length of gestation. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche*; 8p.
25. Cunningham JC, Bradley KG (2008). *Tratado de fisiología veterinaria*. Ed. Elsevier 4a ed. Rio de janeiro.
26. da Costa AP, Leigh AE, Man MS, Kendrick KM (2004). Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *Proceeding of the Royal Society of London* 271:2077-2084.
27. Dallman ME, Viau VG, Bhatnagar S, Gomez F, Laugero K, Bell ME (2002) Corticotropin-releasing factor, corticosteroids, stress, and sugar: energy

balance, the brain, and behavior. 571-631. Proceedings of the National Academy of Sciences

28. Dantzer R, Mormede P (1983). Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal Animal. Science* 57:1-18
29. Damián JP, Ungerfeld R (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 646-650.
30. Damián JP, Hötzel MJ, Banchemo G, Ungerfeld R (2013). Behavioural response of grazing lambs to changes associated with feeding and separation from their mothers at weaning. *Research in Veterinary Science*. 95: 913-918.
31. Désautés C, Sarreau A, Caritez JC, Mormède P (1999). Behavior and pituitary- adrenal function in large white and Meishan pigs. *Domestic animal endocrinology* Vol. 16(4):193–205.
32. Dobson H, Smilh R (2000). *Animal Reproduction Science* 60-61 :743- 752.
33. Dominguez B. Estudio descriptivo sobre la esquila en ovinos y su repercusión en bienestar animal y en la manipulación de la lana en las regiones metropolitana, del libertador general bernardo o'higgins, de los lagos y de los ríos (2013). Tesis de grado. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, escuela de ciencias veterinarias, Universidad de Chile, 80 p.
34. Ducharme N, Banks WA, Morley JE, Robinson SM, Niehoff ML, Mattern C, (2010). Brain distribution and behavioral effects of progesterone and pregnenolone after intranasal or intravenous administration. *European Journal Pharmacology*; 641:128-134.
35. Eigler N, Sacca L, Sherwin RS (1979). Synergistic interactions of physiologic investment of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress induced hyperglycemia, *Journal of Clinical Investigation* 63:114-123.
36. Ensminger, M (1973). *Producción Ovina*. 1ra Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires Argentina.
37. Facultad de Agronomía, UBA. *Prolana* (2017).
38. Favre, B, Moatti, JP (1977). Dosage des corticostéroïdes plasmatiques chez le porcelet. *Ann. Rech. l'&*. 8, 111-120.
39. Freitas- de- Melo A (2013). Efectos del tratamiento con progesterona o de la suspensión del mismo sobre la respuesta de estrés en ovejas. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay .57p
40. Freitas-de-Melo A, Banchemo G, Hötzel MJ, Damián JP, Ungerfeld R (2013). Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal* 7:8. 1367-1373.

41. Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R (2016a). Destete artificial en ovinos: respuesta de estrés y bienestar animal. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*; 7: 365-366.
42. Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R (2016b). Progesterona y respuesta de estrés: mecanismos de acción y sus repercusiones en rumiantes domésticos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*; 7 (2):185-199.
43. Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R, Hötzel MJ, Orihuela A, Pérez-Clariget R (2017). Low pasture allowance until late gestation in ewes: behavioural and physiological changes in ewes and lambs from lambing to weaning. *Animal*. 11:285–294.
38. Galosi RA, Clarke LK, Vasko MR, Crawford IL. (1981). Neurophysiology and neuropharmacology of cardiovascular regulation and stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5: 137-175.
39. Galyean ML, Lee RW, Hubbert ME (1981). Influence of fasting and transit on ruminal and blood metabolites in beef steers. *Journal Animal Science* 53:7-18.
40. Gayrard M, Alvinerie, Toutain PL (1996) interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters v.
41. Glenn J, Larson S, Markegard G, Nelson A, Phillips R, Prince E, Stull C. (1996). *Sheep care practices*. University of California Cooperative Extension, Davis.
42. Gómez B, Escobar A (2006). Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia* 7(1):30-38.
43. Griffin JFT (1989). Stress and immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology Immunopathology*; 20:263-312.
44. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'keefe JA (1994). Ganadal steroid hormona receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior*; 28:464-476.
45. Hargreaves AL, Hutson GD (1889). The stress response in sheep during routine handling procedures. *Applied Animal Behaviour Science* 26: 83-90.
46. Hargreaves AL, Hutson GD (1990). Some effects of repeated handling on stress responses in sheep p253-265.
47. Heinsbroek RPW, van Haaren F, van de Poll NE (1988). Effects of Progesterone on Open Field Behavior of Food Deprived Ovariectomized Female Rats. *Physiology and Behavior*; 43:779-782.

48. Herman JP and Cullinan WE (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in Neurosciences* 20, 78–84.
49. Hiroi R, Neumaier JF (2006). Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behavioural Brain Research* 166:93–100.
50. Jephcott EH, McMillen IC, Rushen JP, Thorburn GD (1987). A comparison of the effects of electroimmobilisation and, or, shearing procedures on ovine plasma concentrations of beta-endorphin/beta-lipoprotein and cortisol. *Research in Veterinary Science* 43, 97– 100.
51. Jezova D, Jurankova E, Mosnarova A, Kriska M, and Skultetyova I (1996). Neuroendocrine response during stress with relation to gender differences. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 56, 779–785.
52. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW (1992). Mechanisms of Stress: A Dynamic Overview of Hormonal and Behavioral Homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16:115-130.
53. Lynch JJ, Alexander G (1980). The effect of time since shearing on sheltering behaviour by Merino sheep. *Australian Society of Animal Productions* 13,32566.
54. Manual de esquila Tally Hi. Gobierno de Chile (2006).
55. Manual práctico de producción ovina. SUL (2011) Montevideo, Uruguay.
56. Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ (2000). Neuroendocrine responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Cambridge, Research Unit, Department of Animal Science, p.43-76.
57. Miller DB and O'Callaghan JP (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* 51 (suppl. 1), 5–10.
58. Moberg GP (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*. Oxon, CABI Publishing, p. 1-22.
59. Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I (2007). Exploration of the hypothalamic - pituitary - adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behaviour* 92:317–339.

60. Moraes MI (2003). El trabajo de la Esquila y los Esquiladores: Algunos Aspectos de su Historia Social, (1860-1979). En: Piñeiro D. Trabajadores de la esquila: pasado y presente de un oficio rural. Montevideo, SUL, p 31-58.
61. Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Raats JG (2009). Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat science*; 81:653-657.
62. Nedkvitne JJ (1972). Effect of Shearing before and after Lambing. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 22:2. 97-102.
63. Orgeur P, Mavric N, Yvone P, Bernard S, Nowak R, Schaal B and Levy F (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal, and immuno-pathological indicators of welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 58, 87–103.
64. Pacák K, Palkovits M (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews* 22(4): 502-548.
65. Ralph CR, and Tilbrook AJ (2016). The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. 94(2):457-70.
66. 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 Behaviour* 3:329-32.
67. Rabasa C (2011). Reevaluación de la teoría de la adaptación al estrés crónico repetido como un proceso de habituación. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma de Barcelona. 195 p.
68. Rhind SM, Mcmillen SR, Duff E, Hirst D, Wright, S (1998). Seasonality of meal patterns and hormonal correlates in red deer. *Physiology and Behavior* 65: 295–302.
69. Romero Peñuela MH, Uribe-Velásquez LF, Sánchez Valencia JA (2011) Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* 10: 171-187.
70. Ruis MAW, Te Brake JHA, Engel B, Ekkel ED, Buist HWG, Blokhuis J, Koolhaas JM (1997). The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology and behaviour* 62(3) 623–630.
71. Rushen J (2000). Some issues in the interpretation of behavioural responses to stress. En: Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. UK, CABI, pp. 23–42.
72. Saikkinen H, Tverdal A, Eloranta E, Dahl E, Holand Ø, Saarela S and Ropsta 2005. Variation of plasma protein parameters in four free-ranging

- reindeer herds and in captive reindeer under defined feeding conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142, 503–511.
73. Sanger ME, Doyle RE, Hinch GN, Lee C (2011). Sheep exhibit a positive judgement bias and stress-induced hyperthermia following shearing. *Applied Animal Behaviour Science* 131, 94-103.
74. Schumacher M, Guennoun R, Ghomari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE (2007). Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocrine Reviews*; 28:387–439.
75. Smith SS, Shen H, Gong QH, Zhou X (2007). Neurosteroid regulation of GABA-a receptors: Focus on the 4 and subunits. *Pharmacology Therapeutics* 116:58-76.
76. Squires EJ (2003). *Applied Animal Endocrinology*. Wallingford, CABI. 234p.
77. 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.
78. Strauss JF, Barbieri RL (2018) Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management. 5a ed. Philadelphia, ed. Elsevier, pp. 125–154.
79. Tempel DL, Leibowitz SF (1994). Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism 6(5):479-501.
80. Tilbrook AJ, Ralph CR (2018). Hormones, stress and the welfare of animals. *Animal Production Science*, 58, 408–415.
81. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 5, 105–113.
82. Trainor BC (2011). Stress responses and the mesolimbic dopaminergic system: Social contexts and sex differences. *Hormones and Behaviour* 60:457-469.
83. Trevisi E, Bertoni G (2009). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*; 8:265-286.
84. Turner AI, Canny BJ, Hobbs RJ, Bond JD, Clarke IJ, Tilbrook AJ (2002). Influence of sex and gonadal status of sheep on cortisol secretion in response to ACTH and on cortisol and LH secretion in response to stress: importance of different stressors. *Journal of Endocrinology* 173, 113–122.

85.Trueba A, Castilla L, Telkänranta H, Muñoz A, Menor-Campo D (2019). Evaluación de estados emocionales en el caballo mediante termografía. XIX Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina. Andalucía Veterinaria p 72.

86.Ungerfeld R, Hötzel MJ, Scarsi A y Quintans G (2011). Behavioral and physiological changes in early-weaned multiparous and primiparous beef cows. *Animal* 5(8):1270–1275.

87.Ungerfeld R, Freitas-de-Melo A, Nowak R, Lévy F (2018b). Preference for mother does not last long after weaning at three months of age in sheep. Enviado.

88.Ungerfeld R, Freitas-de-Melo A (2019). Stress and behavioural responses to winter shearing differ between pregnant and non-pregnant ewes. *Physiology and Behaviour* 210: 112653.

89.Von Borell E, Langbein J, Després G, Hansen S, Leterrier C, Marchant-Forde J, Marchant-Forde R, Minero M, Mohr E, Prunier A, Valance D, Veissier I (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - a review. *Physiology Behaviour* 92: 293-316.

89.Wagenmaker ER, Breen KM, Oakley AE, Tilbrook AJ, Karsch FJ (2010). The estrous cycle of the ewe is resistant to disruption by repeated, acute psychosocial stress. *Biology of Reproduction* 82:1206–1215.