

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**LA OXITOCINA INTRANASAL AFECTA LA RESPUESTA DE ESTRÉS AL  
AISLAMIENTO SOCIAL EN OVEJAS**

**Por**

**ESPINDOLA ALVAREZ, Delfa**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias

Orientación: Producción Animal

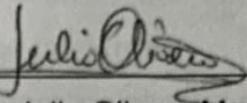
MODALIDAD: ensayo experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2021**

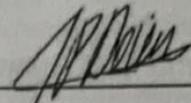
PAGINA DE APROBACION

Tesis de grado aprobada por:

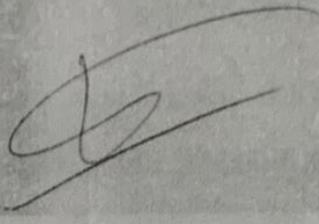
Presidente de mesa:

  
Dr. Julio Olivera Muzante

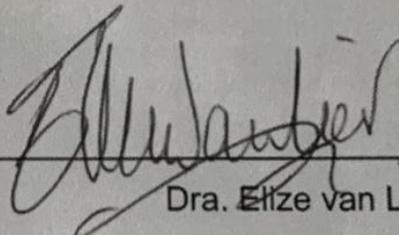
Segundo miembro (Tutor):

  
Dr. Juan Pablo Damián

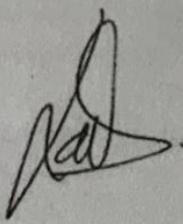
Tercer miembro:

  
Dr. Matías Villagrán Boerr

Cuarto miembro (co-Tutor):

  
Dra. Elize van Lier

Quinto miembro (co-Tutor):

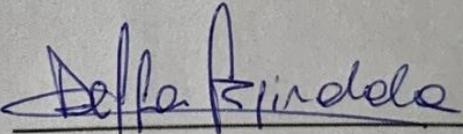
  
Dra. Leticia de Soto Berneda

Fecha:

22 / 02 / 2022

Autores:

nombre completo y firma

  
Della Spindola

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero brindar mi sincero agradecimiento a la Facultad de Veterinaria (UdelaR) por la disciplina y las experiencias brindadas durante mi carrera.

Del mismo modo agradecer a todos los docentes que colaboraron en mi formación académica, que transmitiendo sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional.

También dedicar el agradecimiento a mi tutor Juan Pablo Damián y co-tutoras Elize Van Lier y Leticia de Soto, igualmente al profesor Jorge Gil, quienes fueron fundamentales en la realización de este trabajo, por toda la dedicación y el apoyo brindado.

A la estación experimental de la Facultad de Agronomía (EEFAS) por permitir el uso de las instalaciones y ceder los animales para realizar el ensayo experimental y al grupo de personas que contribuyeron en el desarrollo del trabajo.

En especial agradecer profundamente a mi madre y hermanos quienes son mi cimiento que me han brindado su amor incondicional, y a mis amigas que siempre estuvieron presentes acompañándome en esta hermosa etapa.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Estrés y respuesta de estrés .....	9
1.2 Aislamiento social en ovinos .....	10
1.3 Oxitocina y estrés .....	11
1.4 Transporte de la oxitocina intranasal al cerebro .....	11
2. HIPOTESIS .....	14
3. OBJETIVOS .....	15
3.1 General .....	15
3.2 Específico .....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
4.1 Ubicación, animales y ambiente .....	16
4.2 Test de aislamiento social (OFT) .....	17
4.3 Muestras de sangre .....	18
4.4 Determinación de cortisol, proteínas séricas y glucosa plasmática ....	19
4.5 Parámetros fisiológicos .....	19
4.6 Análisis estadísticos .....	20
5. RESULTADOS .....	21
5.1 Registros comportamentales .....	21
5.2 Parámetros fisiológicos .....	21
5.3 Concentraciones de cortisol sérico .....	22
5.4 Concentraciones de proteínas séricas y glucosa plasmática .....	23
- Proteínas totales .....	23
- Albumina .....	23
- Globulina .....	24
- Glucosa plasmática .....	24

6. DISCUSIÓN.....	26
7. CONCLUSION.....	29
8. BIBLIOGRAFIA.....	30

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema del diseño experimental	18
Tabla 1: Registro de comportamientos	20
Figura 2: Concentración sérica de cortisol	23
Tabla 2: Concentración de proteína sérica y glucosa plasmática	25

## RESUMEN

La oxitocina (OT) es una hormona neuropéptica que modula varios comportamientos sociales y puede afectar la respuesta de ansiedad y estrés. El objetivo de este estudio fue determinar si la administración de OT intranasal afecta la respuesta de estrés al aislamiento social en ovejas. Para eso se asignaron veinte ovejas de raza Merino Australiano adultas a dos grupos: 1) grupo control (GC, n = 10), al que se le administró una solución salina isotónica por vía intranasal y 2) grupo tratado con oxitocina (GOT, n = 10), el que recibió OT por vía intranasal (24 UI). Ambos grupos recibieron la dosificación correspondiente 40 min antes de ser colocados en la prueba de aislamiento social. Durante la prueba de aislamiento social (10 min), se registró el comportamiento de las ovejas y se obtuvieron muestras de sangre antes y después de la prueba para la determinación de cortisol, glucosa y proteínas séricas, y se registró la frecuencia cardíaca y la temperatura superficial en la zona de proyección cardíaca. Las ovejas GOT tuvieron una mayor concentración de cortisol ( $P = 0,04$ ) después del aislamiento social, tendieron a vocalizar más ( $P = 0,06$ ) durante la prueba de aislamiento, y tendían a tener concentraciones de globulina más bajas ( $P = 0,10$ ) que las ovejas GC. La administración de OT intranasal aumentó la respuesta de estrés al aislamiento social en las ovejas, lo cual se evidenció por cambios a nivel endocrino, y probablemente cambios fisiológicos y comportamentales.

**Palabras llave:** oxitocina, estrés, rumiantes, open field test.

## SUMMARY

Oxytocin (OT) is a neuropeptide hormone that modulates various social behaviors and can affect the anxiety and stress response. The objective of this study was to determine whether the administration of intranasal OT affects the stress response to social isolation in sheep. Twenty Australian Merino adult ewes were assigned to two groups: 1) control group (CG, n = 10), which received intranasal administration of isotonic saline solution and 2) group treated with oxytocin (GOT, n = 10), which received the intranasal administration of OT (24 IU). Both groups received the corresponding dosage 40 min before being placed in the social isolation test. During the social isolation test (10 min), the behavior of the sheep was recorded, and blood samples were obtained before and after the test for the determination of cortisol, glucose and serum proteins, and the heart rate and surface temperature were recorded in the cardiac projection area. The GOT ewes had higher cortisol concentrations ( $P = 0.04$ ) after social isolation, tended to vocalize more ( $P = 0.06$ ) during isolation testing, and tended to have lower globulin concentrations ( $P = 0.10$ ) than CG sheep. The administration of intranasal OT increased the stress response to social isolation in sheep, which was evidenced by changes at the endocrine level (increased cortisol concentration), physiological changes (a tendency to present a lower concentration of globulins in blood) and behavioral (higher frequency of vocalizations). This study suggests that intranasal OT administration increased the stress response to isolation possibly by strengthening the social bond between ewes.

**Keywords:** oxytocin, stress, ruminants, social isolation test.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estrés y respuesta de estrés

Sapolsky en 2004 definió al estrés como “el estado de desbalance homeostático”, el cual es inducido por estímulos o eventos denominados “estresores” (Möstl y Palme, 2002; Ron de Kloet et al., 2005). Los estresores pueden clasificarse en dos grandes categorías según la forma en la que actúan: 1) estresores físicos; como la exposición a temperaturas extremas, ruidos, dolor, privación de agua y/o alimento, y 2) estresores psico-sociales dentro de los que se incluye el aislamiento social, interacciones agonistas, cambios de ambiente, miedo y la interacción con humanos (Earley et al., 2010; Ewing et al, 1999). Los estresores también pueden clasificarse de acuerdo a su duración en el tiempo. Los estresores agudos, donde la exposición a ellos es de corta duración, y los crónicos: que inciden de forma prolongada, ya sea de modo continuado o intermitente (Pacák y Palkovits, 2001).

Cuando un animal está bajo estrés, su organismo pone en marcha mecanismos que intentan restablecer el estado de equilibrio, lo cual se denomina “respuesta al estrés” (Daneri, 2012). La respuesta al estrés es de tipo neuroendocrina, e involucra al eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y el eje Simpático-Adreno-Medular (SAM). El primer eje en responder es el SAM (Koscinczuk, 2014), lo cual implica la liberación de adrenalina y noradrenalina desde la médula adrenal, hormonas encargadas de poner al animal en estado de alerta, preparándolo para la lucha o huida (Peñuela et al., 2011). Esta cascada de eventos es continuada por la activación del eje HPA, que comienza con la estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo, donde se produce la síntesis y secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La CRH posteriormente es transportada por el sistema porta-hipofisiario hacia la adenohipófisis para estimular la liberación de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) (Von Borell, 2001). La ACTH es vertida a la circulación general para estimular la secreción de glucocorticoides (GC) desde la corteza adrenal (Anisman et al., 1997; Earley et al., 2010).

El cortisol, la hormona liberada por este estímulo suprarrenal, estimula el catabolismo de proteínas y lípidos de reserva, y la gluconeogénesis, lo que se evidencia por un aumento de la glicemia, de la concentración de lactato y de ácidos

grasos libres en sangre, proporcionando energía para que el organismo pueda responder a la emergencia generada por el estresor (Damián et al., 2015; Ewing et al., 1999; Sapolsky et al., 2000).

## **1.2 Aislamiento social en ovinos**

Los ovinos son animales gregarios que establecen vínculos sociales fuertes entre sus pares (Apple et al, 1993; Romeyer y Bouissou, 1992), por lo tanto, la separación de un individuo de su grupo provoca una importante respuesta de estrés (Damián et al., 2018; Forkman et al., 2007).

Existen pruebas para estudiar la respuesta de los animales al estrés del aislamiento social, entre ellas la prueba de campo abierto (OFT; siglas en inglés “*open field test*”). El OFT, se desarrolló inicialmente en animales de laboratorio y posteriormente fue adaptado para especies domésticas, incluyendo la ovina (Damián et al., 2018; Forkman et al., 2007; Pedernera et al., 2010). Esta prueba consiste en aislar a un individuo de su rebaño o grupo e introducirlo en un nuevo ambiente, desconocido, sin recibir estímulos auditivos y visuales de sus conespecíficos (Damián et al., 2018; Pedernera et al., 2010; Vandenheede et al., 1998). El OFT es una prueba que no es invasiva y permite registrar variables de comportamiento (actividad locomotora: caminatas, intentos de huida, exploración: olfateos, eliminaciones: defecación y micción, y vocalizaciones) (Forkman et al., 2007), las cuales son indicadores comportamentales de la respuesta de estrés, y a mayor frecuencia de las mismas, mayor es la respuesta de estrés al aislamiento (Pedernera et al., 2010).

Al igual que en otras situaciones de estrés, durante el aislamiento social también se generan cambios endócrinos (incremento de ACTH, cortisol), fisiológicos (aumento de frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal) y alteraciones en la bioquímica sanguínea (elevación de la glicemia, ácidos grasos libres, entre otros) (Damián y Ungerfeld, 2013; Damián et al., 2018).

### **1.3 Oxitocina y estrés**

En busca de mitigar las alteraciones generadas por los estresores, ciertas investigaciones han puesto enfoque en los efectos de la oxitocina (OT), evidenciando que la misma puede reducir o atenuar la respuesta al estrés en humanos (Danielle de Oliveira et al., 2018, Ditzen et al., 2009), roedores (Lee et al., 2015), y monos (Jon Cavanaugh et al., 2016). Se trata de una hormona nonapeptídica sintetizada por el hipotálamo (Barrera et al., 2018), que presenta funciones a nivel periférico, participando en las contracciones uterinas en el parto y estimulando la eyección de leche (Lee et al., 2009). También presenta efectos a nivel central, donde ejerce un importante rol en la regulación del comportamiento social (refuerzo del vínculo sexual y materno, reconocimiento de pares, memoria social) (Temesi et al., 2017).

En tal sentido, la OT aparece como una molécula prometedora en relación a sus propiedades antiestrés positivas. Sin embargo, estudios en humanos evidencian que la administración de OT tiene efectos ansiogénicos, por ejemplo, incrementando el estrés percibido, facilitando el condicionamiento del miedo y potenciando la respuesta de sobresalto acústico después de la exposición a imágenes emocionales negativas (Onaka et al., 2019). Además, Gulevich et al. (2019) mostraron que la administración intranasal (IN) de oxitocina en ratas macho aumentó el nivel de corticoides luego de haber sido sometidos a una prueba de estrés (restricción de movimiento por 30 minutos). Estas diferencias en la acción de la OT sobre la respuesta de estrés parecen depender del entorno y situación social en la que se encuentran los animales o personas, ya que las interacciones sociales reducen la respuesta al estrés (Onaka et al., 2019). Por lo tanto, en situaciones sociales adversas o sin apoyo social de congéneres la OT parece generar aumento de la respuesta al estrés.

### **1.4 Transporte de la oxitocina intranasal al cerebro**

Quintana et al. (2020) llevaron a cabo una investigación en la cual se demostró que después de la administración intravenosa e intranasal de OT, sólo se observaron efectos cognitivos y neuronales mediante la vía intranasal. La ineficiencia de la administración periférica por vía intravenosa (IV) de OT esta

explicada por la dificultad que tiene la hormona de pasar la barrera hematoencefálica (BHE) (Dal Monte et al., 2014). La posible ruta que toma la OT para llegar al cerebro y ejercer su efecto tras la administración IN es por medio del transporte directo vía olfativa y fibras del nervio trigémino que inervan la cavidad nasal (Quintana et al., 2018).

Martins et al. (2020) postulan que la OT alcanza el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el parénquima cerebral mediante difusión pasiva a través de hendiduras perineurales en el epitelio nasal. Además, un estudio realizado en monos *Rhesus* demostró la cuantificación de OT en las regiones del cerebro que se encuentran en la trayectoria de inervación de los nervios olfatorio y trigémino luego de la administración de oxitocina deuterada por vía intranasal (Lee et al., 2020). Los autores de este estudio, mencionan que la introducción cerebral de OT después de la administración IN puede ocurrir por transporte extracelular (difusión a lo largo de los nervios olfatorios o trigémino), o mediante transporte intracelular (transporte axonal dentro de los nervios olfatorio y trigémino).

Con base en esta información y en reportes de investigaciones en varias especies [ratas (Gulevich et al., 2019), bovinos (Wagner et al., 2020), monos (Dal monte et al., 2014, Lee et al., 2020, Martins et al., 2020), perros (Temesi et al., 2017) y humano (Martins et al., 2020, Striepens et al., 2013)], donde se muestra que la administración de oxitocina intranasal aumenta a nivel periférico (sangre) y llega al cerebro, se especula que el paso de oxitocina desde la vía intranasal al cerebro también puede ocurrir en ovejas.

Si bien se han desarrollado modelos experimentales en animales, se dispone de poca información en rumiantes sobre el efecto de la administración de OT intranasal y sus efectos sobre la respuesta al estrés. Un estudio en bovinos (Wagner et al., 2020), reportó que el tratamiento con OT intranasal no afectó la respuesta al estrés por aislamiento social. Es importante mencionar que en el estudio realizado por Wagner et al. (2020) sólo se evaluó las concentraciones de cortisol en sangre, pero no otras variables fisiológicas ni comportamentales. Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento no hay investigaciones desarrolladas en pequeños rumiantes (e.g. ovejas y cabras) sobre el efecto de OT intranasal sobre la respuesta de estrés.

En cuanto a la información reportada en ovinos sobre estrés y oxitocina, una investigación llevada a cabo por Cook (1997) buscó determinar si existían

diferencias en la respuesta a factores estresantes entre ovejas en fase de lactación (14 días postparto) y ovejas no lactantes, y determinar si la OT exógena influía en la capacidad de respuesta al estrés. La vía que se utilizó para la administración de oxitocina exógena fue a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo y pituitaria posterior (a través de una cirugía estereotáxica con implantes de sondas de microdiálisis). Los factores estresantes aplicados fueron dos; el aislamiento o restricción en el cual las ovejas lactantes estaban en contacto con su cordero pero se impedía el amamantamiento, y la presencia de un perro ladrando. Los resultados indicaron que las ovejas en lactación tenían niveles de OT significativamente mayores en comparación con ovejas que no se encontraban en lactación y concentraciones más bajas de cortisol, lo que parece estar relacionado con el amamantamiento y las vocalizaciones de la cría. Por otra parte, la respuesta al estrés se vio influenciada por el tipo de estresor, en ovejas en lactación no hubo cambios en las concentraciones de cortisol cuando se sometieron a la prueba de restricción, pero sí se encontraron aumentadas cuando el estresor fue un perro ladrando. Esto último podría vincularse con a que las madres percibieron al perro como amenaza en la supervivencia de sus crías.

Entonces, a partir de este estudio se podría considerar que la respuesta al estrés en ovejas puede variar según el estado de lactancia, presencia de cordero y su capacidad de mamar y el tipo de factor estresante que esté influyendo. Considerando que las ovejas lactando presentan mayores concentraciones de OT en sangre y presentan menor respuesta de estrés que las que no se encuentran en lactación, permite especular que la acción de la OT podría disminuir la respuesta de estrés al aislamiento social.

## **2. HIPOTESIS**

Las ovejas que reciben oxitocina intranasal presentan menor respuesta de estrés frente al aislamiento social que las ovejas que reciben suero salino intranasal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

El objetivo general fue determinar si la administración intranasal de oxitocina afecta la respuesta de estrés al aislamiento social en ovinos.

#### **3.2 Específicos**

Determinar si la administración de OT influye sobre los siguientes indicadores de estrés:

1) comportamentales (vocalizaciones, intentos de escape, locomoción, freezing, eliminaciones) durante el aislamiento social.

2) fisiológicos (frecuencia cardíaca y temperatura superficial) antes e inmediatamente después del aislamiento social

3) bioquímicos y hormonales (proteínas totales, albúmina, globulinas, cortisol y glucosa plasmática) antes y después del aislamiento social.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales, CEUA, Fvet UdelaR (852/2019)

### 4.1 Ubicación, animales y ambiente

El trabajo de campo se realizó en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía Salto (EEFAS) de la Universidad de la República (31°23'15.6"S 57°42'58.8"W), Uruguay. Para el trabajo experimental se utilizaron 20 ovejas adultas (edad promedio 5,5 años), de la raza Merino Australiano que pastoreaban en campo natural y tenían libre acceso al agua. Todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de manejo y alimentación durante el período de estudio (fuera de la estación reproductiva, octubre 2019). Con estos animales se formaron dos grupos experimentales, dividiéndolos aleatoriamente en grupos de 10 animales cada uno: 1) el grupo control (GC,  $45,6 \pm 0,81$  kg de peso corporal) recibió la administración intranasal de suero salino isotónico (0,9% de NaCl), y 2) el grupo oxitocina (GOT,  $45,6 \pm 1,06$  kg de peso corporal) recibió 24 UI de oxitocina por vía intranasal, aplicada en 6 *puffs* intercalados entre cada narina. La oxitocina utilizada tiene pH 7,0. La dosis de OT se eligió en base a lo reportado en investigaciones realizadas en perros (Barrera et al., 2018, Oliva et al., 2015, Persson et al., 2017, Romero et al., 2014) y humanos (MacDonald et al., 2011). La administración de suero salino u oxitocina intranasal en los respectivos grupos se realizó 40 minutos antes de que las ovejas ingresaran a la prueba de aislamiento social (OFT). Cinco ovejas adicionales, no involucradas en el estudio, se mantuvieron en un corral vecino tanto al principio como al final del circuito, de modo que ninguno de los animales probados quedara aislado antes o después de la prueba de aislamiento, evitando así un factor de estrés adicional.

## 4.2 Test de aislamiento social (OFT)

La prueba o test de aislamiento consistió en colocar cada oveja durante 10 minutos en un corral de 3,6 x 3,6 metros de acuerdo a como fue reportado en trabajos previos en ovinos (Ferreira et al., 1992; Forkman et al., 2007; Damián et al., 2018). El piso del corral de prueba era de nylon color negro lavable, que fue marcado cada 0,60 metros con cinta adhesiva blanca determinando 36 cuadrantes iguales (Damián et al., 2018), las paredes eran de tablones pintados de blanco que impedía ver hacia el exterior. A su vez, este corral fue ubicado dentro de un galpón para permitir el aislamiento de estímulos visuales y auditivos entre congéneres, por lo que cada oveja que estaba dentro del OFT no tuvo interacciones visuales, olfativas o auditivas con humanos u otros animales. Los dos grupos de ovejas esperaron en el mismo corral antes de ingresar a la prueba de aislamiento social, y luego de pasar por la prueba se ubicaron en otro corral de salida (Figura 1). Las ovejas fueron trasladadas en forma individual y aleatoria, siempre por el mismo operador hacia el corral de prueba, ingresando en forma alternada entre los grupos experimentales. Se registró el comportamiento que manifestaron las ovejas durante la prueba por medio de filmación, utilizando dos cámaras de video (Sony DCR-SR68, China). Los comportamientos registrados y posteriormente evaluados fueron: vocalizaciones (emisión de cualquier sonido oral), intentos de escape o huida (saltos o retrocesos contra las paredes del corral), eliminaciones (micciones y/o defecaciones), locomoción

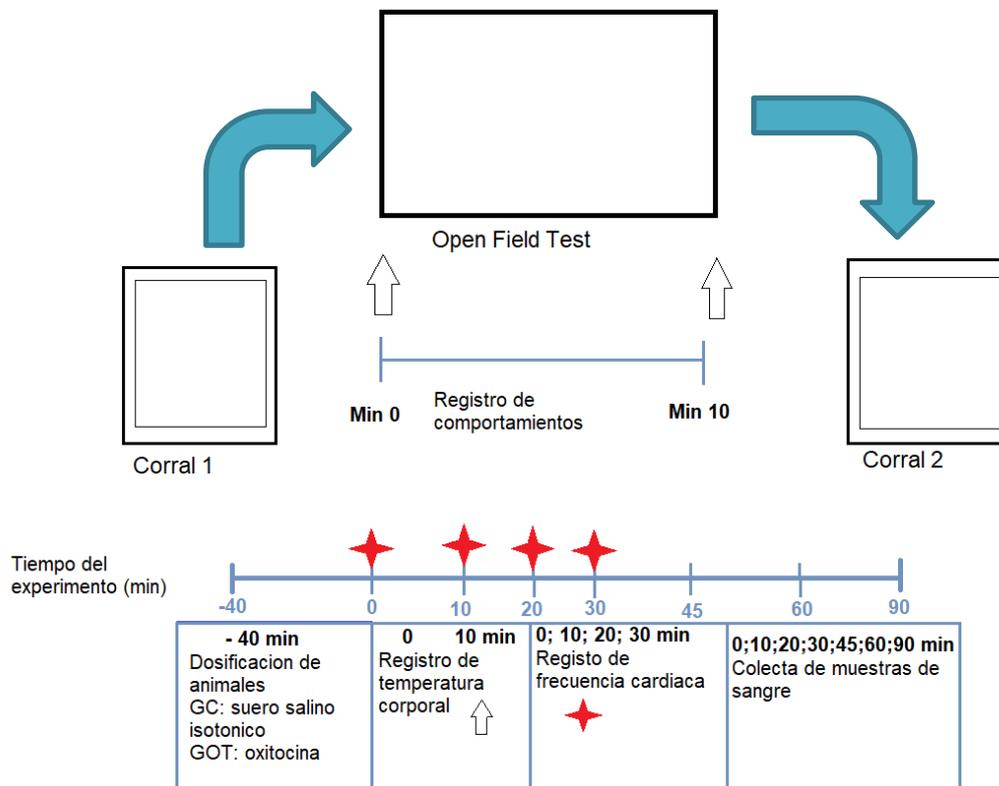


Figura 1: esquema representativo del diseño experimental realizado para establecer el efecto del uso de oxitocina intranasal sobre la respuesta de estrés al aislamiento en ovejas.

Corral 1: corral de espera antes de ingresar a la prueba de aislamiento. Open field test: prueba de aislamiento. Corral 2: corral de salida luego de la prueba de aislamiento. Línea de tiempo: duración del experimento en minutos, y eventos realizados.

### 4.3 Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción de la yugular y depositadas en tubos secos (sin anticoagulante) y en tubos con anticoagulantes (EDTA y Fluoruro de sodio). Dichas muestras se colectaron en los siguientes tiempos (min): -40 (inmediatamente antes de administrar suero salino u oxitocina), 0 (inmediatamente antes de ingresar al corral del aislamiento social), 10 (inmediatamente después de salir del corral del aislamiento social), y a los 20, 30, 45, 60 y 90 min posteriores. Los tubos con la sangre obtenida fueron centrifugados a 1500 rpm por 15 min, y el suero y plasma resultante fueron almacenados a -20°C hasta el análisis de las mismas. La determinación de las concentraciones de cortisol y proteínas séricas se hizo en muestras correspondientes a todos los tiempos, y la

concentración de glucosa plasmática se midió en las muestras colectadas en los tiempos -40, 0, 30, 60 y 90 min.

#### **4.4 Determinación de cortisol, proteínas séricas y glucosa plasmática**

Las concentraciones séricas de cortisol se midieron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay) por radioinmunoensayo utilizando un kit de fase sólida (CORT-CT2 RIA Kit, Cisbio Bioassays, Codolet, France). Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron menos del 10%, y el límite de detección analítica del ensayo fue 7,3 nmol/L. Las concentraciones de proteína sérica se determinaron siguiendo métodos colorimétricos (proteínas totales: reacción de Biuret; albúmina: bromocresol verde) con kits comerciales (Bio-System, Barcelona, España) en el Laboratorio de Bioquímica (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay). La glucosa plasmática se determinó con un método colorimétrico (método oxidasa/peroxidasa) con un kit comercial (Bio-System, Barcelona, España) en el Laboratorio de Análisis Clínicos (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay). Los límites de detección más bajos de estos kits fueron 0,46 g/dL, 0,11 g/dL y 0,23 mg/dL de proteínas totales, albúmina y glucosa, respectivamente. La concentración de globulinas se estimó por la diferencia entre el total proteínas y albúmina (Damián et al., 2020).

#### **4.5 Parámetros fisiológicos**

El registro de la temperatura corporal se hizo con un termómetro digital laser infrarrojo (Nicety ® ST530+, Nicety Mould Co., Ltd, Shenzhen City, China) en la piel de la región cardíaca. Se tomaron dos registros; uno antes del ingreso a la prueba (tiempo cero) y otro inmediatamente a la salida de la prueba de aislamiento (a los 10 minutos). La frecuencia cardíaca se registró mediante auscultación en el área de proyección cardíaca en cuatro momentos: antes del ingreso al aislamiento, y luego al momento de la salida (min 10) y en los 20 y 30 minutos siguientes.

#### 4.6 Análisis estadísticos

Se utilizó el paquete estadístico de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) para analizar todos los datos. Se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas de la frecuencia cardíaca, la temperatura superficial, el cortisol, las proteínas séricas y los datos de glucosa plasmática utilizando el procedimiento mixto. La estructura de covarianza utilizada fue autorregresiva de primer orden. Los efectos principales estudiados fueron el tratamiento (GC vs GOT), el tiempo y la interacción entre el tratamiento y el tiempo como efectos fijos, y la oveja en cada grupo como efecto aleatorio. El tiempo se consideró como una medida repetida en el modelo. Se realizaron comparaciones *post hoc* con el test de Tukey-Kramer. Las variables medidas a partir de muestras de sangre (cortisol, proteínas totales, albúmina, globulinas y glucosa) se analizaron por separado según los tiempos de muestreo. Un primer análisis involucró los tiempos -40 y 0 como niveles basales, dado que entre estos tiempos los animales no fueron sometidos a una situación de estrés, solo la administración de oxitocina en el tiempo -40. Se realizó un segundo análisis desde el tiempo 0 (inmediatamente antes del estrés de aislamiento social) hasta los 90 min después del factor estresante. Además, si existió una tendencia o efecto significativo del tratamiento en el análisis ANOVA, se realizó un análisis complementario comparando el área bajo la curva entre ambos grupos mediante la prueba t de Student. Los resultados de las variables no significativamente afectadas por tratamiento ni la interacción entre tratamiento y tiempo se presentan juntos para ambos grupos. Las frecuencias de todos los comportamientos registrados durante la prueba de aislamiento social se compararon entre ovejas de GC y GOT con la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados se consideraron significativos con un  $\alpha \leq 0.05$  y como tendencia cuando el alfa estuvo entre 0,06 y 0,10. Se calcularon los tamaños del efecto con la d de Cohen y los tamaños del efecto se interpretaron como: efectos pequeños  $d = 0,25$ , efectos medianos  $d = 0,50$  y efectos grandes  $d = 0,80$ . Para los valores de  $\eta^2_p$  se interpretaron como de efecto pequeño: 0,01, efecto mediano hasta 0,06 y efecto grande por encima de 0,14, (Cohen et al. 1988; Lakens et al. 2013). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM o error estándar agrupado (pSE), a menos que se indique lo contrario.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Registros comportamentales

Las ovejas del GOT tendieron a vocalizar más que las ovejas del GC ( $U = 25,5$ ,  $P = 0,06$ ; y con gran tamaño del efecto:  $d$  de Cohen =  $0,90$ ), pero no hubo diferencias significativas entre los grupos en los otros comportamientos (Tabla 1).

Tabla 1: Comportamientos (media  $\pm$  SEM por 10 min) registrados en las ovejas del grupo control (GC) y el grupo tratado con oxitocina (GOT) durante la prueba de aislamiento social.

Comportamiento	GC	GOT	U	P
Intentos de escape	2,2 $\pm$ 1,8	0,5 $\pm$ 0,4	40,0	0,43
Estado de alerta	3,4 $\pm$ 1,5	3,3 $\pm$ 0,8	38,0	0,37
Eliminaciones	0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3	44,0	0,74
Locomoción	100,9 $\pm$ 15,6	86,2 $\pm$ 14,3	41,0	0,53
Vocalizaciones	13,7 $\pm$ 6,2	28,1 $\pm$ 5,8	25,5	0,06

Las frecuencias de todos los comportamientos fueron registradas durante la prueba de aislamiento social y se compararon entre las ovejas GC ( $n = 10$ ) y ovejas GOT ( $n = 10$ ) con la prueba U de Mann-Whitney, P es el nivel de significancia.

### 5.2 Parámetros fisiológicos

No hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,38$ ) ni interacción entre el tratamiento y el tiempo ( $P = 0,98$ ) en la frecuencia cardíaca. La frecuencia cardíaca varió con el tiempo ( $F(3,54) = 18,40$ ;  $P < 0,0001$ ): aumentó desde 0 a 10 min ( $87,8 \pm 3,9$  latidos/min frente a  $118,0 \pm 3,9$  latidos/min, Tukey-Kramer:  $P < 0,0001$ , respectivamente), luego disminuyó desde los 10 min hasta los 20 min ( $97,8 \pm 3,9$  latidos/min:  $P = 0,0053$ ) y recuperó el nivel basal a los 30 min ( $90,7 \pm 3,9$  latidos/min). No hubo efecto del tratamiento ni interacción entre el tratamiento y tiempo en la temperatura medida en el área de la superficie cardíaca. La

temperatura superficial aumentó desde inmediatamente antes ( $35,5 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  a 0 min) hasta inmediatamente después ( $36,6 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  a 10 min) de la prueba de aislamiento ( $F(1,18) = 4,87$ ;  $P = 0,04$ ).

### 5.3 Concentraciones de cortisol sérico

En las muestras obtenidas antes del estrés del aislamiento social (min -40 y min 0) no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,70$ ), tiempo ( $P = 0,69$ ) ni interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,79$ ). En las muestras obtenidas entre el min 0 (inmediatamente antes del estrés del aislamiento social) y el min 90 hubo un efecto significativo del tratamiento: las ovejas GOT tuvieron mayores concentraciones de cortisol en suero que las ovejas GC ( $51,1 \pm 3,83$  vs  $39,15 \pm 3,83$  nmol/L, respectivamente;  $F(1,18) = 4,87$ ;  $P = 0,04$  y gran tamaño del efecto:  $\eta^2_p = 0,21$ ). Hubo un efecto significativo del tiempo sobre la concentración sérica de cortisol ( $F(6,107) = 12,58$ ;  $P < 0,0001$ ): la cual aumentó desde el min 0 y alcanzó valores máximos a los 20 min (Tukey-Kramer:  $P < 0,0001$ ). A partir de los 20 min las concentraciones disminuyeron hasta los 60 min (Tukey-Kramer:  $P < 0,0001$ ), permaneciendo estables en los niveles basales hasta el final del experimento (90 min) (Tukey-Kramer:  $P = 0,83$ ) (Figura 2). Hubo una interacción significativa entre tratamiento y tiempo ( $F(6,107) = 2,55$ ;  $P = 0,02$ ): las ovejas GOT tuvieron concentraciones de cortisol más altas que las ovejas GC a los 10 minutos (Tukey-Kramer:  $P = 0,0039$ ; y gran tamaño del efecto:  $d$  de Cohen = 1,88) (Figura 2). Además, las ovejas GOT tuvieron mayor área bajo la curva para la concentración de cortisol, que las ovejas del GC desde el min 0 al min 90 ( $4520,80 \pm 345,18$  nmol/L frente a  $3502,50 \pm 295,66$  nmol/L, respectivamente,  $t = 2,24$ ,  $p = 0,038$ ; y gran tamaño del efecto:  $d$  de Cohen = 1,00).

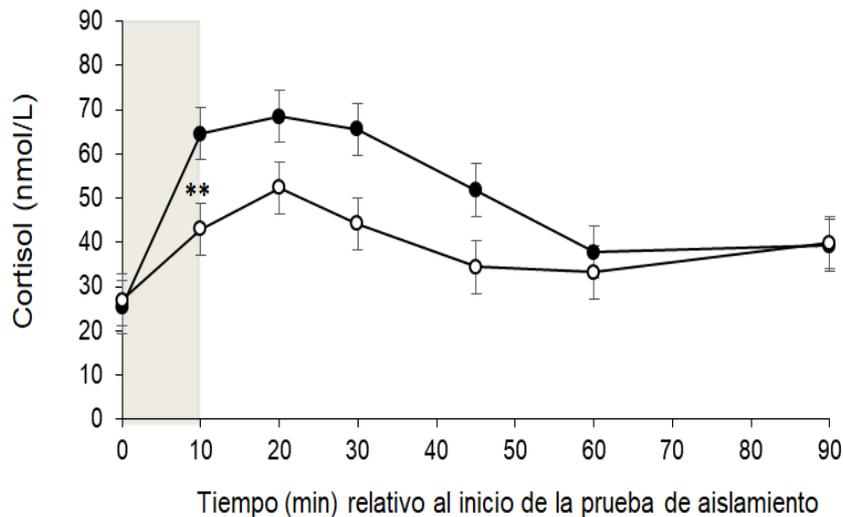


Figura 2. Concentraciones de cortisol sérico (media  $\pm$  error estándar combinado) antes y después de la prueba de aislamiento social (open field test) de ovejas del grupo control (GC: -o-) y ovejas tratadas con Oxitocina (GOT: -●-). El área sombreada muestra el período de la prueba de aislamiento social (10 min). Los asteriscos (\*\*) indican diferencias significativas entre los grupos (GC vs GOT) en un mismo tiempo (Tukey-Kramer  $p < 0,01$ ).

#### 5.4 Concentraciones de proteínas séricas y glucosa plasmática

##### - Proteínas totales

En las muestras obtenidas antes del estrés del aislamiento social (min -40 y min 0) no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,41$ ), tiempo ( $P = 0,95$ ) ni interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,94$ ) en la concentración de proteínas totales. En las muestras obtenidas a partir del min 0 (inmediatamente antes del estrés social de aislamiento) hasta los 90 min no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,34$ ), tiempo ( $P = 0,51$ ) ni interacción entre tratamiento y tiempo ( $P = 0,26$ ) en la concentración de proteínas totales (Tabla 2).

##### - Albúmina

En las muestras obtenidas antes del estrés del aislamiento social (min -40 y min 0) no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,11$ ), tiempo ( $P = 0,13$ ) ni interacción entre tratamiento y tiempo ( $P = 0,81$ ) en la concentración de albúmina. En las muestras obtenidas a partir del min 0 (inmediatamente antes del estrés del aislamiento social)

hasta los 90 min no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,51$ ) ni interacción entre tratamiento y tiempo ( $P = 0,34$ ) en la concentración de albúmina (Tabla 2). Hubo un efecto de tiempo ( $F(6,106) = 10,72$ ;  $P < 0,0001$ ), observándose una disminución de la concentración de albúmina desde el tiempo 0 min a los 90 min ( $P = 0,0005$ ).

#### - **Globulina**

En las muestras obtenidas antes del estrés del aislamiento social (min -40 y min 0) no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,63$ ), tiempo ( $P = 0,54$ ) ni interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,81$ ) en la concentración de globulina. En las muestras obtenidas desde el min 0 (inmediatamente antes del estrés del aislamiento social) hasta los 90 min, las ovejas del GOT tendieron a presentar concentraciones más bajas de globulina que las ovejas del GC ( $3,23 \pm 0,10$  g/dL frente a  $3,48 \pm 0,10$  g/dL, respectivamente,  $F(1,19) = 2,97$ ;  $P = 0,10$  y tamaño del efecto medio:  $\eta^2p = 0,135$ ) (Tabla 2). Hubo un efecto del tiempo ( $F(6,105) = 2,62$ ;  $P = 0,02$ ): la concentración de globulina disminuyó desde los 10 min a los 90 min (Tukey-Kramer:  $P = 0,0094$ ) (Tabla 2). Hubo una tendencia de interacción entre el tratamiento y el tiempo ( $F(6,105) = 1,83$ ;  $P = 0,10$ ) en la concentración de globulina: las ovejas GOT tendieron a presentar concentraciones más bajas de globulina que las ovejas CG en el tiempo 30 min (Tukey-Kramer:  $P = 0,07$ ; y gran tamaño del efecto:  $d$  de Cohen = 1,49). Además, no hubo diferencia en el área bajo la curva para la concentración de globulina entre ovejas GOT y ovejas GC de 0 min a 90 min ( $296,6 \pm 6,7$  g/dL frente a  $311,8 \pm 11,8$  g/dL, respectivamente,  $t = -1,12$ ,  $p = 0,28$ ; medio tamaño del efecto:  $d$  de Cohen = 0,50).

#### - **Glucosa plasmática**

En las muestras obtenidas antes del estrés del aislamiento social (min -40 y min 0) no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,50$ ), tiempo (-40 min:  $54,65 \pm 1,98$  mg / dL vs 0 min:  $56,61 \pm 1,98$  mg / dL,  $P = 0,28$ ) ni interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,35$ ) en la concentración de glucosa. Hubo un efecto del tiempo ( $F(3,51) = 7,80$ ;  $P = 0,0002$ ): la concentración de glucosa aumentó con el tiempo 0 a 30 min ( $P = 0,006$ ), luego tendió a aumentar de tiempo de 30 min a 60 min ( $P = 0,08$ ) y se mantuvo en niveles altos hasta 90 min (Tabla 2). A los 90 min no hubo efecto del tratamiento ( $P = 0,86$ ) ni interacción entre tratamiento y tiempo ( $P = 0,70$ ) en la concentración de glucosa.

Tabla 2- Concentraciones de proteínas séricas (proteína totales, albúmina y globulina, g/dL) y concentración de glucosa (mg/dL) (media  $\pm$  pSE) de ovejas en el grupo control (GC) y en el grupo tratado con oxitocina (GOT) antes (0 min) y después (tiempo 10, 20, 30, 45, 60 y 90 min) de la prueba de aislamiento social, con los respectivos valores de probabilidad (P) para los efectos del Tratamiento (Tr), Tiempo (Ti) e interacción entre tratamiento y tiempo

	Tiempo (min)							P			
	0	10	20	30	45	60	90	pSE	Tr	Ti	Tr*Ti
Proteína total	7,05	7,18	7,15	6,91	6,89	6,97	7,08	0,13	ns	ns	ns
Albumina	4,02 <sup>a</sup>	4,16 <sup>a</sup>	3,86 <sup>ab</sup>	3,46 <sup>c</sup>	3,55 <sup>bc</sup>	3,57 <sup>bc</sup>	3,36 <sup>c</sup>	0,10	ns	<0,0001	ns
Globulina	3,03 <sup>ab</sup>	3,02 <sup>a</sup>	3,46 <sup>ab</sup>	3,47	3,53 <sup>ab</sup>	3,39 <sup>ab</sup>	3,73 <sup>b</sup>	0,16	0,10	0,02	0,10
Glucosa	56,6 <sup>a</sup>			66,3 <sup>b</sup>		72,0 <sup>b</sup>	72,0 <sup>b</sup>	4,48	ns	0,0002	ns

a, b, c: indican diferencias significativas entre puntos de tiempo dentro de las líneas (Tukey-Kramer  $p < 0.05$ ). pSE: error estándar agrupado; ns: no significativo.

## 6. DISCUSIÓN

Contrariamente a la hipótesis propuesta, las ovejas del GOT tuvieron mayor respuesta de estrés al aislamiento social, evidenciada por cambios endocrinos (aumento en la concentración de cortisol), y apoyada por posibles cambios en la bioquímica sanguínea (tendencia a disminuir la concentración de globulina) y el comportamiento (tendencia a una mayor frecuencia de vocalizaciones) con respecto a las ovejas del GC.

El estresor utilizado en este experimento fue el aislamiento social, un estresor psicosocial. Debido a que las ovejas son animales de comportamiento gregario (Romeyer y Bouissou, 1992, Apple et al 1993, Forkman et al., 2007, Damián et al., 2018), la separación de un individuo de su grupo provoca una importante respuesta de estrés. La respuesta de estrés por aislamiento social se registró tanto en animales del GC como del GOT, evidenciado por aumento en la concentración de cortisol. La respuesta de estrés registrada en los animales que recibieron OT concuerda con otros estudios. Se ha reportado que la acción de la OT y la respuesta de estrés dependen de la situación social, el entorno o circunstancias en las que el individuo se encuentra. Sin apoyo de sus pares, o sin “amortiguación social” como es la situación del estrés del aislamiento social, la oxitocina incrementa el estrés percibido (Onaka et al., 2019, Gulevich et al 2019, Turner et al., 1999, Taylor et al 2006). En este sentido, los resultados del presente estudio sugieren que la administración de oxitocina podría haber reforzado el deseo de establecer vínculo social entre las ovejas, lo que generó que fueran más sensibles a la separación.

Entre los comportamientos observados durante la prueba de aislamiento en el OFT, las ovejas tratadas con oxitocina tendieron a vocalizar más que las ovejas del grupo control y con un gran tamaño de efecto. Para nuestro conocimiento, ningún otro estudio ha evaluado los efectos de la administración intranasal de oxitocina sobre vocalizaciones ante las situaciones de estrés por aislamiento social en ovinos. Las vocalizaciones son comportamientos que se despliegan entre otras cosas para buscar o establecer contacto social con sus congéneres, por ejemplo, cuando los corderos son separados de sus madres al destete (Damián et al., 2013,

Forkman et al., 2007, Napolitano et al., 2008, Romeyer et al., 1992). Además, las vocalizaciones son importantes indicadores de estrés y del bienestar animal, que se manifiestan también en otros contextos sociales en ovejas

Las proteínas séricas son indicadores bioquímicos de cómo los animales responden frente a situaciones de estrés (Damián et al., 2018, Odeón y Romera, 2017). El hecho de que las ovejas tratadas con oxitocina tendieron a presentar concentraciones más bajas de globulinas que las ovejas del grupo control podría asociarse con una mayor respuesta de estrés al aislamiento en el OFT de las ovejas GOT que GC. Este resultado se ha encontrado en otros estudios en ovejas utilizando el mismo factor de estrés (Damián et al., 2018) y podría vincularse al efecto inmunosupresor de altas concentraciones de cortisol (Damián et al., 2018, Horton et al., 1996, Krawczel et al., 2007). En tal sentido, la tendencia a una menor concentración de globulinas en el grupo tratado con OT intranasal refuerza el concepto de que este grupo de ovejas presentó una mayor respuesta de estrés al aislamiento social.

No se observaron diferencias entre grupos en la respuesta al estrés en la frecuencia cardíaca, temperatura, proteínas totales, concentraciones de albúmina y glucosa plasmática. La ausencia de efecto de la oxitocina sobre la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal concuerda con estudios anteriores realizados en ovejas por (Cook, 1997), en donde la oxitocina fue administrada a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo y en la pituitaria posterior. La mencionada administración de OT no afectó la frecuencia cardíaca o la temperatura rectal en respuesta a la exposición aguda al ladrido de un perro (Cook, 1997). Por lo tanto, los presentes resultados en conjunto con los de Cook (1997) sugieren que la OT no influiría en el eje simpático adrenomedular y el sistema termorregulador en ovejas.

En un estudio realizado por Wagner et al. (2020) en vaquillonas *Bos taurus*, el tratamiento intranasal con oxitocina aumentó la respuesta de estrés por aislamiento y restricción física, obteniendo mayores concentraciones de cortisol y ACTH con respecto al grupo control. Además de trabajar sobre una especie diferente, es importante señalar que en nuestro estudio la dosis de intranasal de oxitocina en relación al peso corporal (0,53 UI / Kg PV) fue casi el doble respecto a

la utilizada en bovinos (0,30 UI / Kg PV, Wagner et al., 2020). En la investigación llevada a cabo por Wagner et al. (2020), no se evaluó la respuesta comportamental al estrés en los bovinos. Por lo tanto, nuestro estudio, además de ser el primero en evaluar los efectos de la administración intranasal de oxitocina sobre la respuesta al estrés en ovejas, también sugiere que dicho tratamiento podría influir en el comportamiento desplegado en respuesta al aislamiento social en rumiantes.

En trabajos futuros se podría estudiar si el efecto de la administración intranasal de OT ante el estrés por aislamiento social difiere entre machos y hembras, y si las hormonas sexuales influyen en dicha respuesta de estrés. Turner et al. (2002) reportaron que el estrés de aislamiento/restricción en ovinos causó mayor concentración de cortisol en hembras que en machos y mayor concentración de cortisol en animales enteros (con presencia de gónadas) que en aquellos gonadectomizados. Van Lier et al. (2003 y 2014) estudiaron las diferencias entre los sexos en la secreción de cortisol por la corteza adrenal. Para ello, utilizaron carneros y ovejas gonadectomizados que posteriormente fueron suplementados con hormonas sexuales. Los resultados obtenidos por Van Lier et al., 2014 indicaron que las ovejas presentaban mayores concentraciones de cortisol basal con respecto a los carneros. Y a su vez, la concentración de cortisol fue mayor en ovejas suplementadas con benzoato de estradiol en comparación con las ovejas gonadectomizadas que no recibieron la hormona. Sin embargo, no se observaron diferencias en las concentraciones de cortisol entre carneros suplementados con cipionato de testosterona y machos no suplementados. Por lo tanto, esto sugiere que la secreción de cortisol estaría modulada por los estrógenos pero no por la testosterona. En este sentido, serían necesarios más estudios en ovinos con el fin de evaluar el tipo de respuesta obtenida ante la administración IN de OT en diferentes categorías y según su condición reproductiva; por ejemplo hembras ciclando vs. hembras en anestro, y carneros (machos enteros) vs capones (machos castrados). Además, tal como se describió anteriormente, la respuesta de estrés difería según el estado fisiológico de la oveja y según el estresor utilizado (Cook, 1997). Con este enfoque sería de interés estudiar cómo varía la de respuesta ante diferentes estresores (sociales, físicos, metabólicos o combinaciones de estos), lo que permitiría profundizar en el conocimiento de cómo regular la respuesta del eje HPA y el impacto de la respuesta de estrés en los animales de producción.

## **7. CONCLUSION**

La administración de oxitocina intranasal aumentó la respuesta de estrés al aislamiento social en las ovejas, lo cual se evidenció por un mayor aumento en la concentración de cortisol, tendencias a vocalizar más y a presentar una menor concentración de globulinas en la sangre.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Anisman H., Zaharia M., Meaney M., Merali Z. (1997). Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Dev. Neurosci.* 16.149-164.
- Apple J.K., Minton J.E., Parsons K.M., Unruh J.A. (1993). Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *Journal of Animal Science* 71.71-77.
- Barrera G., Dzik V., Cavalli C., Bentsosela M. (2018). Effect of intranasal oxytocin administration on human-directed social behaviors in shelter and pet dogs, *Front. Psychol.* 9 .22-27.
- Cavanaugh J., Carp S., Rock C.M., French J.A. (2016). Oxytocin modulates behavioral and physiological responses to a stressor in marmoset monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 66.22–30.
- Cohen J, (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd Edition, Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ.
- Cook C.J. (1997) Oxytocin and prolactin suppress cortisol responses to acute stress in both lactating and non-lactating sheep, *J. Dairy Res* 64. 327–339.
- Dal Monte O., Noble P.L., Turchi J., Cummins A., Averbeck B.B. (2014). CSF and blood oxytocin concentration changes following intranasal delivery in Macaque. *PLoS ONE* 9.103-677.
- Damián J.P., Bausero M., Bielli A. (2015). Acute stress, hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis and testicular function – A Review. *Ann Anim. Sci* 15. 31–50.
- Damián J.P., Hötzel M.J., Banchero G., Ungerfeld R. (2018). Growing without a mother during rearing affects the response to stressors in rams. *Appl. Anim. Behav. Sci* 209. 36–40.
- Damián J.P., Terrazas A., Cabrera E., Simonetti S., Aragunde R., Fila D. (2020) Growth of fetal bones and metabolic profile during gestation in primiparous ewes and multiparous ewes, *Reprod. Domest. Anim.* 55. 1180–1189.
- Damián J.P., Ungerfeld R. (2013) Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 21. 103-113.
- Daneri F. (2012) *Psicobiología del Estrés* -Trabajo Práctico. Recuperado de <https://www.psi.uba.ar>

- Ditzen B., Schaer M., Gabriel B., Bodenmann G., Ehlert U., Heinrichs M. (2009) Intranasal Oxytocin Increases Positive Communication and Reduces Cortisol Levels During Couple Conflict. *Biol. Psychiatry*. 65. 728–731.
- Earley B., Buckham-Sporer K., Gupta S., Pang W., Ting S. (2010). Biologic response of animals to husbandry stress with implications for biomedical models. *Anim. Physiol*. 2. 25-42.
- Ewing S.A., Lay Jr.D.C., von Borell E. (1999). Farm animal well-being: stress physiology, animal behavior, and environmental design. *Upper Saddle River, Prentice Hall*, 357 p.
- Ferreira A., Carrau A., Rodas E., Rubianes E., Benech A. (1992). Diazepam Facilitates Acceptance of Alien Lambs by Postparturient Ewes. *Physiol Behavior*. Vol. 51, pp. 1117-1121
- Forkman B., A., Boissy, M., C., Salaün E., Canali R.B., Jones. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behavior* 92:340–374.
- Gulevich R., Kozhemyakina R., Shikhevich S., Konoshenko M., Herbeck Y. (2019). Aggressive behavior and stress response after oxytocin administration in male Norway rats selected for different attitudes to humans. *Physiol. Behavior* 210–218.
- Horton G., Baldwin J., Emanuele S., Wohlt J., McDowell L. (1996) Performance and blood chemistry in lambs following fasting and transport, *Anim. Sci.* 62. 49–56.
- Krawczel P.D., Friend T.H., Caldwell D.J., Archer G., Ameiss K. (2007). Effects of continuous versus intermittent transport on plasma constituents and antibody response of lambs, *J. Anim. Sci.* 85. 468–476.
- Koscinczuk P. (2014) Ambiente, adaptación y estrés. *Rev. vet.* 25: 1, 67-76.
- Lakens D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs, *Front. Psychol.* 26. 863.
- Lee M.R., Shnitko T.A., Blue S.W., Kaucher A.V., Winchell A.J., Erikson D.W. (2020). Labeled oxytocin administered via the intranasal route reaches the brain in rhesus macaques, *Nat. Commun.* 11. 27-83.
- Lee S.Y, Park S.H, Chung C., Kim J.J., Cho S.Y., Han J.S. (2015) Oxytocin Protects Hippocampal Memory and Plasticity from Uncontrollable Stress. *Scientific Reports* 5:18540

- Lee H.J., Macbeth A.H., Pagani J.H., Scott Young W. (2009). Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.* 88. 127–151.
- Mac Donald E., Dadds M.R., Brennan J.L., Williams K., Levy F., Cauchi A.J. (2011). A review of safety, side-effects and subjective reactions to intranasal oxytocin in human research. *Psychoneuroendocrinology* 36. 1114–1126.
- Martins D.A., Mazibuko N., Zelaya F., Vasilakopoulou S., Loveridge J., Oates A. (2020). Effects of route of administration on oxytocin induced changes in regional cerebral blood flow in humans, *Nat. Commun.* 11. 11-60.
- Möstl E., Palme R. (2002). Hormone as indicator of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23. 67-74.
- Napolitano F., De Rosa G., Sevi A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 110. 58–72.
- Odeón M.M., Romera S.A. (2017) Stress in productive animals: causes and consequences. *Rev. vet.* 28: 69-77.
- Oliva J.L., Appleton R.B., Lill A. (2015). Oxytocin enhances the appropriate use of human social cues by the domestic dog (*Canis familiaris*) in an object choice task, *Anim. Cogn.* 18. 767–775.
- Oliveira C.G., Zuardi A.W., Graeff F.G., Queiroz A.W., Crippa J. (2012) Anxiolytic-like effect of oxytocin in the simulated public speaking test. *Journal of Psychopharmacology* 26(4) 497–504.
- Onaka T., Takayanagi Y. (2019) Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *Journal of Neuroendocrinology* 31: 1-20
- Pacák K., Palkovits M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22: 502-548
- 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 Behavior* 94.329–332
- Peñuela M.H., Uribe-Velasquez L.F., Sanchez J.A. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud ISSN* 1657-9550
- Persson M.E., Trottier A.J., Bélteky J., Roth L., Jensen P. (2017) Intranasal oxytocin and a polymorphism in the oxytocin receptor gene are associated with

- human-directed social behavior in golden retriever dogs. *Hormones and Behavior* 95. 85–93
- Quintana D.S., Lischke A., Grace S., Scheele D., Ma Y., Becker B. (2020). Advances in the field of intranasal oxytocin research: lessons learned and future directions for clinical research, *Molecular Psychiatry* 26. 80-91
- Quintana D.S., Smerud K.T., Andreassen O.A., Djupesland P.G. (2018). Evidence for intranasal oxytocin delivery to the brain: recent advances and future perspectives, *Ther. Deliv.* 9. 515–525.
- Romeyer A., Bouissou M.F. (1992). Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci* , 34. 93-119.
- Ron de Kloet E., Joëls M., Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. Sapolsky R.M. (2004). Social status and health in humans and other animals. *Annu Rev Anthropol* 33: 393-418.
- Sapolsky R.M., Romer L.M., Munck A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21.55–89.
- Striepens N., Kendrick K.M., Hanking V., Landgraf R., Wüllner U., Maier W. (2013) Elevated cerebrospinal fluid and blood concentrations of oxytocin following its intranasal administration in humans, *Sci. Rep.* 6. 34-40.
- Taylor S.E., Gonzaga G.C., Klein L.C., Hu P., Greendale G.A., Seeman T.E. (2006). Relation of oxytocin to psychological stress responses and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in older women, *Psychosom Med.* 68. 238–245.
- Temesi A., Thuróczy J., Balogh L., Miklósi A. (2017). Increased serum and urinary oxytocin concentrations after nasal administration in beagle dogs. *Front. Vet. Sci.* 4. 147.
- Turner A.I., Canny B.J., Hobbs R.J., Bond J.D., Clarke I.J., Tilbrook A.J. (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, *J. Endocrinol* 173. 113–122.
- Turner R.A., Altemus M., Enos T., Cooper B., McGuinness T. (1999) Preliminary research on plasma oxytocin in normal cycling women: investigating emotion and interpersonal distress, *Psychiatry* 62. 97–113.

- Vandenheede M., Bouissou MF., Picard M. (1998) Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 58. 293–310
- Van Lier E., Carriquiry M., Meikle A. (2014) Sex steroid modulation of cortisol secretion in sheep. *Animal* 8:6 960-967.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.* 79 (81–92).
- Von Borell E.H. (2001). The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J. Anim. Sci.* 79. 260–267
- Wagner B.K., Relling A.E., Kieffer J.D., Parker A.J (2020) Intranasal oxytocin treatment does not attenuate the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in beef heifers subjected to isolation stress or restraint and isolation stress. *Domesti. Anim. Endocrinol.* 70.106 379