



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**Desarrollo reproductivo, comportamiento sexual y respuesta de estrés de
carneros que fueron criados artificialmente o por sus madres**

Dr. Juan Pablo Damián

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**Desarrollo reproductivo, comportamiento sexual y respuesta de estrés de
carneros que fueron criados artificialmente o por sus madres**

Dr. Juan Pablo Damián

**Dr. Rodolfo Ungerfeld, Ph.D.
Director de Tesis**

**Dra. María José Hötzel, Ph.D.
Dra. Georgget Banchemo, Ph.D.
Co - Directores de Tesis**

2016

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

“Desarrollo reproductivo, comportamiento sexual y respuesta de estrés de carneros que fueron criados artificialmente o por sus madres”

Por: Mag. Juan Pablo DAMIÁN

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Codirectoras de Tesis: Dra. Maria José Hötzel
Dra. Georgett Banchemo

Tribunal

Presidente: Dr. Alejandro Bielli

Segundo Miembro: Dr. Adroaldo Zanella

Tercer Miembro: Dr. Felipe Zandonadi Brandao

Cuarto Miembro: Dra. Daniella Agrati

Quinto Miembro: Dr. Jorge Gil

Fallo del Tribunal: APROBADO CON MENCIÓN

20 de febrero de 2017



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Postgrados Académicos y Especializaciones

El Tribunal considera que la Tesis de Doctorado del Dr. Juan Pablo Damián representa un trabajo profundo, extenso y sistemático. El manuscrito se encuentra bien estructurado, con hipótesis y objetivos claros, que son respondidos de forma adecuada en base a un diseño experimental sólido. Los resultados son abundantes, originales y relevantes como aporte para el área del conocimiento. El material generado en la investigación tiene potencial para generar nuevas preguntas y experimentos, tanto a nivel básico como aplicado. Dio origen a 5 artículos científicos, 2 de los cuales ya están publicados.

El candidato realizó una excelente exposición oral y defensa de tesis demostrando que tiene un profundo conocimiento del tema y flexibilidad para incorporar puntos de vista complementarios. Respondió solventemente a las distintas preguntas y cuestionamientos.

Por lo anteriormente mencionado, el Tribunal por unanimidad califica el presente trabajo de Tesis de Doctorado: **“Desarrollo reproductivo, comportamiento sexual y respuesta de estrés de carneros que fueron criados artificialmente o por sus madres”** como Aprobado con Mención.

Dr. Alejandro Bielli
Presidente del Tribunal

DEDICATORIA

A mis amores Ili y Sofi,

a mis padres y hermanos,

y a todos aquellos que ya son parte de mi familia...

AGRADECIMIENTOS

A Rodolfo Ungerfeld, quién fue mi tutor no sólo del doctorado sino también de la maestría, y por tanto de mi formación académica. Recuerdo el día de la defensa de la maestría como el momento más importante y alegre de mis actividades académicas, y en ese sentido estoy muy agradecido a Rodolfo. En los finales de la tesis de maestría Rodolfo ya estaba pensando en mi futuro próximo, y es ahí cuando me elije y ofrece la posibilidad de hacer esta tesis de doctorado. Agradezco especialmente a Rodolfo por todo lo que me enseñó durante el proceso de doctorado. La disciplina, el rigor por siempre mejorar, la visión crítica, el ser sumamente detallista y casi obsesivo, el estar siempre a disposición (sea fin de semana, feriados o paros), la paciencia, la constancia, la prolijidad, el concentrarse en los conceptos generales importantes más que en las variables, son algunos ejemplos de las muchas razones por las que agradezco a Rodolfo. Además de la enseñanza en los aspectos más importantes del proceso de doctorado y la tesis, como el diseño y realización de experimentos, la discusión y análisis de resultados y la escritura de los artículos científicos, Rodolfo me ha enseñado y ayudado en otras muchas actividades. Rodolfo me enseñó a revisar artículos científicos y a hacer aportes a la comunidad científica desde esa visión, me ha ayudado a escribir proyectos, a participar en congresos nacionales e internacionales e interactuar con los científicos más reconocidos en nuestra área de interés. Entre tantas cosas vividas en este período de tesis hemos hablado mucho de la academia, e incluso de aspectos más filosóficos, y más allá del acuerdo o desacuerdo, valoro la sinceridad y el respeto. También agradezco a Rodolfo por haberme acompañado en momentos difíciles que me han tocado vivir durante este proceso. En estos 8 años trabajando juntos y aprendiendo en cada uno de los procesos, Rodolfo me ha apoyado y me ha ayudado a crecer y a mejorar en mi formación académica, y por tanto siempre le estaré muy agradecido.

A María José Hötzel, mi co-tutora de tesis, por sus muy buenos aportes y disposición, siempre recibiendo y contestando en forma rápida a pesar de la distancia, con una visión crítica y ayudando y mejorando en el diseño y escritura de los artículos y la tesis. Agradezco a María José por sus visitas y participación en la defensa de proyecto, por las charlas y discusiones científicas que aportaron a los trabajos y a mi formación.

A Georgget Banchemo, mi co-tutora de tesis, por la posibilidad de realizar esta tesis de doctorado en la Unidad de Ovinos del INIA “La Estanzuela”. Gracias a Georgget pudimos contar con los animales y condiciones necesarias para poder hacer todos los trabajos experimentales de campo, incluyendo los potreros y alimentación, el cuidado y sanidad de los animales, y por permitirnos usar las instalaciones de la Unidad. Gracias a Georgget por la ayuda en la coordinación de actividades experimentales, por la revisión de los artículos y la tesis.

A los compañeros de proyecto: A Florencia Beracochea por toda su ayuda durante todo el proceso experimental, desde inicio a fin, siempre con una gran responsabilidad y haciendo un trabajo impecable, gracias por toda la ayuda y muy especialmente en la evaluación de la calidad seminal. A Laura Morena, una compañera que estuvo ayudando en todas las actividades experimentales y que ayudó a que todo el trabajo se realice mejor y con alegría. A Marcela Canabal, quien colaboró activamente en el cuidado y manejo de los animales durante la primera etapa experimental y nos ayudó a controlar mejor las condiciones de trabajo. A todas les estoy muy agradecido, pues además de trabajar perfectamente son excelente personas.

A mis compañeros de Bioquímica: A Celia Tasende, una persona muy especial, una “madre”, una “confidente”, una “compañera”, una “guía”, que siempre me ha ayudado en todas las actividades sin pedir nada a cambio, todo desde el afecto y la confianza, gracias por tanta generosidad, gracias por creer en mí. Celia siempre me apoyó y me brindó esa fuerza necesaria y ánimo en los momentos que más lo necesité. Gracias por transmitirme esa fuerza y convicción de luchar por lo que uno quiere. Gracias a Celia, pues ella fue una de las primeras personas que me sugirió trabajar con Rodolfo y me ayudó en toda mi formación. Con Celia hemos coincidido en la mayoría de las cosas y aunque también hemos tenido nuestras sanas discrepancias, siempre hemos aprendido mutuamente a escuchar y respetar al otro, y por tanto a crear un vínculo que se ha fortalecido con el tiempo, con sinceridad, honestidad, confianza y principalmente con cariño. A Aline Freitas de Melo, quién vino a Montevideo desde Brasil para ayudarme en uno de los experimentos de la Maestría y hoy en día es una gran compañera. Gracias por tu ayuda, por tu seriedad y responsabilidad en el trabajo, por ser muy cuidadosa y siempre atenta y con ganas de aprender, ayudar y colaborar en diferentes actividades de bioquímica y de investigación. Ambos hemos compartido momentos lindos y también pasamos por momentos muy difíciles, y siempre hubo apoyo, sinceridad, respeto y ayuda. Muchas gracias Aline por tu amistad. A Marcelo Rodríguez, por permitirme realizar las actividades de investigación y doctorado, por darme la confianza y libertad en el trabajo de docencia, por apoyarme en muchas actividades. A Inés Sacchi, Daniela Casuriaga, Cecilia López, Gonzalo García, compañeros de labor docente en bioquímica, por la buena disposición y ayuda en todos estos años. A Perla Rubianes por su apoyo y amistad de siempre, una persona muy especial y de gran confianza.

A los tesis de grado Laura Morena, Santiago Machado, Carol Abelenda, María Jesús Ramírez, Guillermo Arotce, César Deragón, Conrado Rodríguez y Santiago Alonso, y a los estudiantes Manuel Castrillón y Natalia Irarí, todos sus aportes fueron muy importantes y de gran ayuda en los procesos experimentales de esta tesis, siempre apoyando con la mejor disposición y buen humor.

A los compañeros de estudios de posgrado, Lorena Lacuesta, Julia Giriboni, Matías Villagrán y Fernando Fumagalli con quienes compartimos este proceso de

aprendizaje, y me ayudaron durante todo el camino desde diferentes enfoques y sentires. Gracias por la buena disposición, por el compartir la alegría, por estar ahí y apoyarme siempre, gracias por la amistad y la confianza.

A las personas de la Unidad de Ovinos del INIA La Estanzuela, a Damián González, Alberto García, Sofía Moraes, y Nestor Sanguinetti que nos ayudaron en manejo y cuidado de los animales.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Fondo Clemente Estable 626-2009 - ANII) por el financiamiento de este proyecto.

A la CSIC, que me permitió ir al Congreso Internacional de ISAE 2012 realizado en Viena, y presentar parte de mis resultados de la presente tesis.

A los compañeros metodistas, por compartir la fe, los valores cristianos y humanos y por el compromiso social.

A mis padres Martha y Juan, por darme la vida, el amor y la libertad para vivirla.

A mis hermanos Gerardo, Beatriz, Alejandro y Magalí, por regalarme la felicidad de vivir en familia, por enseñarme a cuidar desde niño los valores más importantes del ser humano, por enseñarme a pensar y a descubrir el mundo, por el cariño y la fuerza que siempre recibí y me ayudaron a superar todas las adversidades.

Por todos los que son parte de mi familia y siento como tal, Leo, Magui, William, Mariela, Jim, Fer, Ali, Rafa y Clau, Gaby y Pablo, Florencia, por la amistad, por su apoyo incondicional, por enseñarme tanto en la vida.

A mis amigos, Rodrigo Comesaña, Paula De Oliveira, Pablo Hermosilla, Martín Borba, Diego Macellaro, Adriana Nusspaumer, Solana González, Federico Galusso por siempre estar en las buenas y malas, gracias por el cariño.

A Alvaro González-Olascuaga, un gran maestro y amigo que me regalo la vida.

A Ili, por tu amor y apoyo incondicional, por tu paciencia, por acompañarme siempre en este largo viaje, más allá de las ausencias y complicaciones, por ser tan compañera, sensible y por regalarme todos los colores...

A Sofi, la bendición y regalo más lindo de mi vida, por enseñarme que la realidad puede superar los sueños, por la belleza y ternura, por ayudarme cada día a vivir el presente y a reconocer lo verdaderamente importante, gracias por ayudarme a ser mejor persona.

APÉNDICE

Publicaciones I-V

Este trabajo de tesis está basado en las siguientes publicaciones, las que se encuentran referenciadas en el texto mediante números romanos.

- I. Damián, J.P., Hötzel, M.J., 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.
- II. Damián, J.P., Beracochea, F., Hötzel, M.J., Banchemo, G., Ungerfeld, R. 2015. Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. *Physiology and Behavior* 147, 47-53.
- III. Damián, J.P., Beracochea, F., Machado, S., Hötzel, M.J., Banchemo, G., Ungerfeld, R. 2016. Growing without a mother results in poorer sexual behaviour in adult rams. *Animal* (en segunda revisión).
- IV. Damián, J.P., Hötzel, M.J., Banchemo, G., Ungerfeld, R. Competition for oestrous ewes between rams reared with their mothers or artificially reared: Effects on sexual behaviour and testosterone and cortisol responses. Enviado para su publicación.
- V. Damián, J.P., Hötzel, M.J., Banchemo, G., Ungerfeld, R. Stress of social isolation and challenge to ACTH in rams reared by their mothers or artificially reared. Manuscrito en preparación.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción y antecedentes	3
1.1 Vínculo madre-cría en ovinos	3
1.2 Destete: interrupción del vínculo madre-cría	4
1.3 Factores sociales que afectan del desarrollo reproductivo y el comportamiento sexual	5
1.4 Interacciones sociales y competencia, actividad sexual y respuesta de estrés	6
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	9
4. Materiales y métodos	10
4.1 Animales, ubicación y manejo general	10
4.2 Procedimientos Experimentales	11
4.2.1 Publicación I	12
4.2.2 Publicación II y III	12
4.2.3 Publicación IV	12
4.2.4 Publicación V	13
4.3 Análisis Estadísticos	13
5. Resultados	14
5.1 Publicación I	14
5.2 Publicación II	14
5.3 Publicación III	14
5.4 Publicación IV	14
5.5 Publicación V	15
6. Discusión general	16

7. Conclusiones	20
8. Referencias	21
9. Anexos	27

Resumen

La madre influye sobre el desarrollo de sistemas fisiológicos y sociales, y contribuye al éxito reproductivo futuro de la misma. El objetivo general de la tesis fue demostrar que la madre también influye en el comportamiento social y la fisiología reproductiva de los carneros. Se trabajó con dos grupos de corderos, uno criado por sus madres (grupo CM, n=13) y otro criado artificialmente (grupo CA, n=14). Los corderos CM se destetaron y los CA se deslecharon a los 75 días de vida. Se registró el comportamiento de los corderos antes y luego del destete. Se realizó un seguimiento continuo de los corderos a lo largo de 2 años de vida registrando variables fisiológicas, reproductivas y de comportamiento sexual. Se realizaron tests sexuales en competencia con otros carneros y tests de aislamiento social en diferentes momentos del desarrollo. En esta tesis se demostró la importancia de la presencia y vínculo de la madre con los corderos durante la lactación, dado que fue un factor central en la respuesta comportamental del cordero al estrés del destete (Publicación I), contribuyó a un desarrollo reproductivo más precoz de los corderos y a un mayor despliegue del comportamiento sexual frente a hembras en celo (Publicación II), el que se mantuvo hasta que los carneros fueron adultos (Publicación III). Los carneros criados por sus madres fueron menos afectados por la competencia en los tests sexuales (Publicación IV) y presentaron mayor respuesta de estrés al aislamiento social (Publicación V) que los criados artificialmente. En conclusión, la presencia y vínculo con la madre durante la lactación influyó positivamente en el comportamiento sexual de los carneros, tanto en forma individual como en competencia, y contribuyó al gregarismo, lo que se demostró en una mayor respuesta al aislamiento social.

Abstract

The mother influences the development of physiological systems and social behavior of the animals, contributing to their future reproductive success. The aim of the thesis was to demonstrate that the mother also influences the social behavior and the reproductive physiology of the rams. For this, lambs were reared in two experimental groups: 1) reared by their mothers (group CM, n = 13); 2) artificially reared (group CA, n = 14). The CM lambs were weaned, and CA lambs stopped drinking milk at 75 days of age. The behavior of lambs before and after weaning was recorded. All lambs were monitored continuously for 2 years, recording their sexual behavior and physiological and reproductive variables. At different stages of development, sexual tests in competition with other rams and social isolation tests were performed. This thesis demonstrated the importance of the presence and link of the mother with the lambs during lactation, since it was a key and main factor in the behavioral response of lambs to weaning stress (Publication I), contributed to an earlier reproductive development of lambs and to a greater display of sexual behavior toward estrous ewes (Publication II), difference that persisted the rams were adults (Publication III). Rams reared by their mothers were less affected by competition in sexual tests (Publication IV) and presented greater stress response to social isolation (Publication V) than those artificially reared. The presence and link with the mother during lactation had a positive influence in rams' sexual behavior, including competitive tests, and contributed to gregariousness as it was shown in the social isolation test.

1. Introducción y antecedentes

1.1. Vínculo madre-cría en ovinos

La madre contribuye al éxito reproductivo futuro de la cría a través del cuidado, aumentando las probabilidades de que sobreviva y promoviendo el crecimiento de la misma (Kendrik et al., 1997; Nowak et al., 2000, 2011; Dwyer, 2014). Los ovinos presentan un comportamiento netamente gregario, pero antes del parto las ovejas se separan de su grupo para elegir un lugar apartado y aislado donde parir (Alexander et al., 1990; Dwyer y Lawrence, 2005). El comportamiento de separarse de su grupo antes del parto contribuye a la formación de un adecuado vínculo con su cordero, y por tanto, a aumentar la probabilidad de supervivencia del mismo (Nowak et al., 2000; Dwyer y Lawrence, 2005; Nowak y Poindron, 2006). Las ovejas paren crías precoces, con un buen desarrollo de sus capacidades motoras y sensoriales, lo que permite un rápido reconocimiento y establecimiento del vínculo oveja-cordero, el que se mantiene al menos hasta los 4 a 6 meses posparto (Arnold et al., 1979; Hinch et al., 1987, 1990). El reconocimiento y mantenimiento del vínculo entre la madre y el cordero se establece a través de diferentes vías de comunicación. Luego del parto, la oveja reconoce a su cría por señales químicas captadas y fijadas a través del olfateo y lamido materno (Alexander, 1978; Alexander y Stevens, 1981; Vince y Ward, 1984), el que también estimula la actividad y el movimiento de las crías (Sharafeldin y Kandeel, 1971). Estos comportamientos estimulan a los corderos a levantarse y seguir, y a mamar calostro dentro de las primeras dos horas posparto (Nowak y Poindron, 2006). En ese período se establece un vínculo fuertemente selectivo entre la oveja y el cordero, lo que determina que la madre rechace e impida que otras crías puedan mamar de ella, mostrando incluso conductas agresivas hacia las que lo intentan (Poindron et al., 1993; Levy et al., 1996; Nowak y Poindron, 2006). La oveja también aprende a reconocer a su cordero mediante estímulos auditivos y visuales desde los primeros días posparto (Nowak, 1991; Keller et al., 2003; Nowak et al., 2011).

La madre provee comida, calor, refugio y protección de depredadores de modo de garantizar las mejores chances de supervivencia hasta el destete (Nowak et al., 2000). El primer vínculo social de los corderos es con su madre, por lo que las relaciones sociales

posteriores están influidas por estas primeras interacciones (Lévy y Keller, 2008). La atención materna durante la vida temprana regula el desarrollo de sistemas fisiológicos, sociales, emocionales, cognitivos y comportamentales en el desarrollo de la descendencia (Levine et al., 1967; Hofer, 1994; Hall, 1998). Las preferencias sensoriales se desarrollan a través de las interacciones con la madre e influyen en la selección de alimentos cuando los animales son adultos, en el comportamiento materno y la elección de pareja o preferencia para la copula (Fillion y Blass, 1986; Kendrick et al., 1998; Nowak et al., 2000; Shah et al., 2002).

1.2. Destete: interrupción del vínculo madre-cría

En condiciones naturales, el destete implica un cambio gradual y progresivo en la ingesta de alimento vinculado con el desarrollo del sistema digestivo del cordero, incluyendo una reducción en la ingesta de leche y un incremento en el consumo de dieta sólida (Arnold et al., 1979). Estos cambios en la alimentación durante el proceso de destete natural se ven acompañados de una gradual independencia social de la cría respecto a su madre (Napolitano et al., 2008; Weary et al., 2008). Dependiendo de la raza y las condiciones ambientales, el destete natural ocurre entre los 4 y 6 meses de edad del cordero (Arnold et al., 1979).

En condiciones productivas los corderos son separados abruptamente de sus madres antes de que finalice el proceso natural de destete, y por tanto la ruptura del vínculo madre-cría provoca una importante respuesta de estrés (Orgeur et al., 1998; Napolitano et al., 2008). La respuesta de estrés al destete artificial involucra diferentes estresores: el social (generado por la separación de su madre y la integración a un nuevo grupo social), el nutricional (generado por el cambio abrupto en la dieta, dejar de consumir leche y pasar exclusivamente a consumir una dieta sólida y agua), la imposibilidad de acceder a la ubre y el cese del comportamiento de succión (Napolitano et al., 2008; Weary et al., 2008). La respuesta comportamental al estrés del destete se evidencia por un incremento de la actividad de locomoción y la cantidad de vocalizaciones en los corderos y sus madres (Alexander, 1977; Orgeur et al., 1998; Napolitano et al., 2008). Schichowsky et al. (2008) observaron que los corderos a los que se les impide succionar de sus madres una semana antes de la separación vocalizan menos que aquellos separados en forma abrupta y permanente,

demostrando la importancia del dejar de succionar e ingerir leche y los cambios en la alimentación en la respuesta de estrés. En forma similar, los principales comportamientos indicadores de estrés (vocalizar y costear) aumentan menos luego del destete abrupto en terneros a los que previamente se les impidió la succión con tablillas nasales (Enríquez et al., 2010; Hötzel et al., 2012). Por tanto, dejar de succionar e ingerir leche explica parcialmente la respuesta de estrés al destete. Sin embargo, no se conoce la importancia relativa que provocan los cambios asociados a las modificaciones en la alimentación (no poder acceder a la ubre, el cese de la succión, y los cambios a una dieta sólida y agua) y a la separación de la madre sobre la respuesta comportamental desplegada por los corderos luego del destete artificial.

1.3. Factores sociales que afectan el desarrollo reproductivo y el comportamiento sexual

El ambiente social temprano afecta los parámetros reproductivos, el comportamiento sexual y la respuesta de estrés en ovinos. Por ejemplo, la posición jerárquica, el contacto con hembras y la exposición a hembras en celo en corderos prepuberes condicionan el desarrollo reproductivo y el comportamiento sexual en la etapa adulta. Por ejemplo, los corderos de alto rango social crecen más y maduran sexualmente antes que los de bajo rango (Ungerfeld y González-Pensado, 2008), pero tales diferencias disminuyen cuando los carneros son adultos (Ungerfeld y Lacuesta, 2010). La ausencia de hembras durante el desarrollo prepuberal atrasa los avances en la producción de semen en corderos (Casteilla et al., 1987), genera un menor aumento en las concentraciones séricas de testosterona y en el tamaño testicular (Illius et al., 1976), retrasa el desarrollo del comportamiento sexual y disminuye la capacidad de servicio cuando llegan a adultos (Zenchak y Anderson, 1980; Price et al., 1991; 1994; 1996; Stellflug y Lewis, 2007). Sin embargo, la ausencia de hembras durante el desarrollo temprano de los corderos no afecta los parámetros seminales cuando son adultos (Le Roux y Barnard, 1974; Zenchak y Anderson, 1980).

Aunque la madre es el principal vínculo social que influye sobre el cordero (Mirza y Provenza, 1992; Lindsay, 1996; Dwyer y Lawrence, 2000), existe escasa información sobre cómo afecta el comportamiento sexual y los parámetros reproductivos durante el desarrollo y la etapa adulta. Kendrick et al. (1998) observaron que el vínculo de los corderos con sus

madres es suficientemente fuerte e intenso como para determinar la preferencia sexual de los carneros. En efecto, los corderos que fueron criados por cabras prefirieron montar cabras que ovejas cuando llegan a la edad adulta. Por otra parte, Al-Nakib et al. (1986) observaron que los corderos criados por sus madres presentaron un desarrollo sexual más temprano y un retraso en el interés sexual por ovejas en celo que los corderos criados artificialmente. Sin embargo, es importante resaltar que en el trabajo de Al-Nakib et al. (1986) la cantidad de alimento ofrecido a los corderos criados artificialmente no fue ajustado en relación a lo que recibieron los corderos criados por sus madres, los que tuvieron una mayor ganancia de peso. Dado que el desarrollo reproductivo está fuertemente influenciado por el peso corporal (Dýrmundsson y Lees, 1972; Brown, 1994), las diferencias en el desarrollo reproductivo de los corderos criados con o sin sus madres reportada por Al-Nakib et al. (1986) está confundida con el peso corporal de los mismos.

La mayoría de los trabajos en que se evaluó el efecto del vínculo madre-cría sobre el desarrollo reproductivo y el comportamiento sexual en machos fueron realizados en roedores. En varios estudios se reportó que las ratas machos criadas por madres que despliegan una frecuencia alta de lamidos en la región ano-genital de sus crías presentan un mayor despliegue del comportamiento sexual cuando adultas que aquellas criadas por madres con menor frecuencia (Moore, 1984; Brike y Sadler, 1987; Moore, 1992). En el mismo sentido, la separación temporaria de las madres de ratas machos durante el desarrollo posnatal temprano impacta negativamente sobre el comportamiento sexual cuando llegan a su vida adulta (Rhees et al., 2001). Sin embargo, la deprivación maternal en ratas durante el período de lactación no afecta la producción seminal de sus hijos cuando llegan a ser adultos (Lau et al., 1996).

1.4. Interacciones sociales y competencia, actividad sexual y respuesta de estrés

En servicios colectivos los machos compiten con otros machos por el acceso a las ovejas en celo. La propia competencia es un estresor que provoca aumentos en las concentraciones séricas de cortisol (Lacuesta y Ungerfeld, 2012). La actividad reproductiva es una de las principales funciones que se alteran como consecuencia del estrés (Johnson et al., 1992; Tilbrook et al., 2000). En machos, el comportamiento sexual es muy sensible a los

estresores (Moberg, 1985). La competencia entre carneros por una hembra en celo afecta el despliegue del comportamiento sexual (Tilbrook y Cameron, 1990). Un carnero dominante puede suprimir o inhibir la actividad de monta de otro carnero subordinado, incluso sin que exista contacto directo entre ellos (Lindsay et al., 1976; Synnott et al., 1981; Tilbrook y Cameron, 1990). En general, los carneros reducen el despliegue del comportamiento sexual cuando compiten con otros carneros (Price et al., 2001; Ungerfeld y González-Pensado, 2009, Ungerfeld y Lacuesta, 2015).

La respuesta de estrés de los carneros afecta el comportamiento sexual y repercute negativamente en la respuesta endócrina, por ejemplo, disminuyendo la secreción de LH (Matteri et al., 1984) y testosterona (Damián y Ungerfeld, 2011). Sin embargo, la propia actividad sexual con una hembra en celo también genera una respuesta de estrés en carneros, incrementando las concentraciones séricas de cortisol (González et al., 1988; Borg et al., 1992). A diferencia de otros estresores, la actividad sexual (exposición a una hembra en celo y monta) estimula la respuesta endócrina y la consecuente secreción de LH y testosterona en carneros (Yarney y Sanford, 1983; Ungerfeld y Silva, 2004).

Dentro de las interacciones sociales, la presencia y vínculo con la madre durante la vida temprana es fundamental para el cordero, dado que afecta el desarrollo de sistemas fisiológicos, las interacciones sociales y emocionales (Levine et al., 1967; Hofer, 1994; Hall, 1998; Lévy y Keller, 2008). Por ejemplo, los corderos criados por sus madres presentan mayor respuesta de estrés al aislamiento social luego de la pubertad que aquellos criados artificialmente (Romeyer et al., 1992; Vandenheede et al., 1993), posiblemente por ser más dependientes de su grupo social. Por lo tanto, dado que la respuesta de estrés varía de acuerdo a como los carneros fueron criados, la respuesta al estrés de la competencia por una hembra en celo puede también afectar la secreción de testosterona.

2. Hipótesis

2.1 Hipótesis General

La presencia y vínculo con la madre durante la lactación influye directamente en el comportamiento social y en la fisiología reproductiva de los carneros.

2.2 Hipótesis específicas

La presencia y vínculo con la madre durante la lactación:

2.2.1 juega un rol clave y central en la respuesta comportamental del cordero al estrés del destete.

2.2.2 influye positivamente en la fisiología reproductiva y el comportamiento sexual durante el desarrollo y la etapa adulta de los carneros.

2.2.3 influye positivamente en la actividad sexual y en la concentración sérica de testosterona de los carneros en competencia por una hembra en celo.

2.2.4 contribuye a una mayor respuesta de estrés al aislamiento social, al desafío con ACTH y a los tests sexuales individuales y en competencia por hembras en celo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

El objetivo de la tesis fue demostrar que la presencia y vínculo con la madre durante la lactación influye directamente en el comportamiento social y en la fisiología reproductiva de los carneros.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Comparar la respuesta comportamental de estrés al destete artificial abrupto entre corderos criados por sus madres y corderos criados artificialmente (Publicación I).

3.2.2 Determinar si la presencia de la madre durante la lactación afecta los parámetros reproductivos y el comportamiento sexual hacia ovejas en celo durante el desarrollo y la etapa adulta de los carneros (Publicación II y III).

3.2.3 Comparar el comportamiento sexual y la concentración sérica de testosterona entre los tests competitivos y no competitivos por una oveja en celo en carneros criados por sus madres y en carneros criados artificialmente (Publicación IV).

3.2.4 Comparar la respuesta de estrés al aislamiento social, al desafío con ACTH y a los tests sexuales individuales y en competencia por hembras en celo en carneros criados por sus madres y en carneros criados artificialmente (Publicación IV y V).

4. Materiales y métodos

4.1 Animales, ubicación y manejo general

El trabajo de campo se realizó en la unidad de Ovinos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental “La Estanzuela” (Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay). Se trabajó con 27 corderos machos de raza Polwarth (Ideal) que nacieron en el mes de setiembre de 2011, todos hijos de 3 carneros de la misma raza. Todos los corderos fueron de parto único y nacieron con un rango de 12 días de diferencia.

Las ovejas gestantes fueron mantenidas en un mismo potrero bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. Se formaron dos grupos experimentales de forma homogénea de acuerdo al día y peso del cordero al parto: 1) grupo de corderos separados de las madres a las 24-36 horas después de nacidos y criados artificialmente (grupo CA, n=14); y 2) grupo de corderos criados por las madres hasta los 75 días de vida (grupo CM, n=13).

Los corderos CA fueron alimentados a través de tetinas artificiales con leche proveniente del ordeño de las madres y de otras ovejas. La cantidad de leche y frecuencia de administración se ajustó para mantener un peso corporal similar a la de los corderos CM. Durante los primeros 7 días de vida se les suministró 0,5 - 0,7 L/día dividido en 6 tomas diarias, a las 8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 8 al 15 los corderos recibieron 0,8 - 1 L/día dividido en 4 tomas diarias a las 8:00 h, 12:00 h, 16:00 h y 19:00 h. Desde el día 16 hasta el día de destete, los corderos recibieron 3 tomas diarias 8:00 h, 12:00 h y 19:00 h. A partir del día 16 hasta el día 30 se les suministró 1,0 - 1,3 L/día, y desde el día 31 hasta el día 75 recibieron 1,4 - 1,6 L/día. Durante la alimentación los corderos CA tuvieron el mínimo contacto necesario con el personal que les administró la leche. Todos los corderos fueron pesados cada 7-15 días. Para reducir las diferencias en las relaciones sociales, en el grupo de los corderos CA se incluyó a otras 4 ovejas adultas que tenían corderos de edad similar a los corderos experimentales.

Todos los corderos se alojaron en dos corrales cerrados durante la noche con una temperatura ambiental de 20 a 23°C durante los primeros 15 días de vida. A partir de los 15 días, los dos grupos se manejaron en diferentes potreros de 25 x 50 m cada uno. Los corderos tuvieron libre acceso a sombra artificial (área=4,5 m², altura=0,8 m).

El destete se realizó cuando los corderos tuvieron en promedio 75 días de vida (rango: 69 a 81 días). Las madres de los corderos CM y las 4 ovejas con sus corderos alojadas en el potrero de los corderos CA fueron trasladadas a otro potrero donde no tenían contacto visual ni acústico con los corderos experimentales. En ese mismo momento los corderos CA dejaron de recibir leche. A partir de este momento ambos grupos de corderos se manejaron en un mismo potrero dividido en dos durante todo el período experimental, suministrándoseles concentrados y agua *ad libitum*.

4.2 Procedimientos experimentales

En la Figura 1 se presenta una línea de tiempo de los experimentos realizados en esta tesis indicando las publicaciones correspondientes.

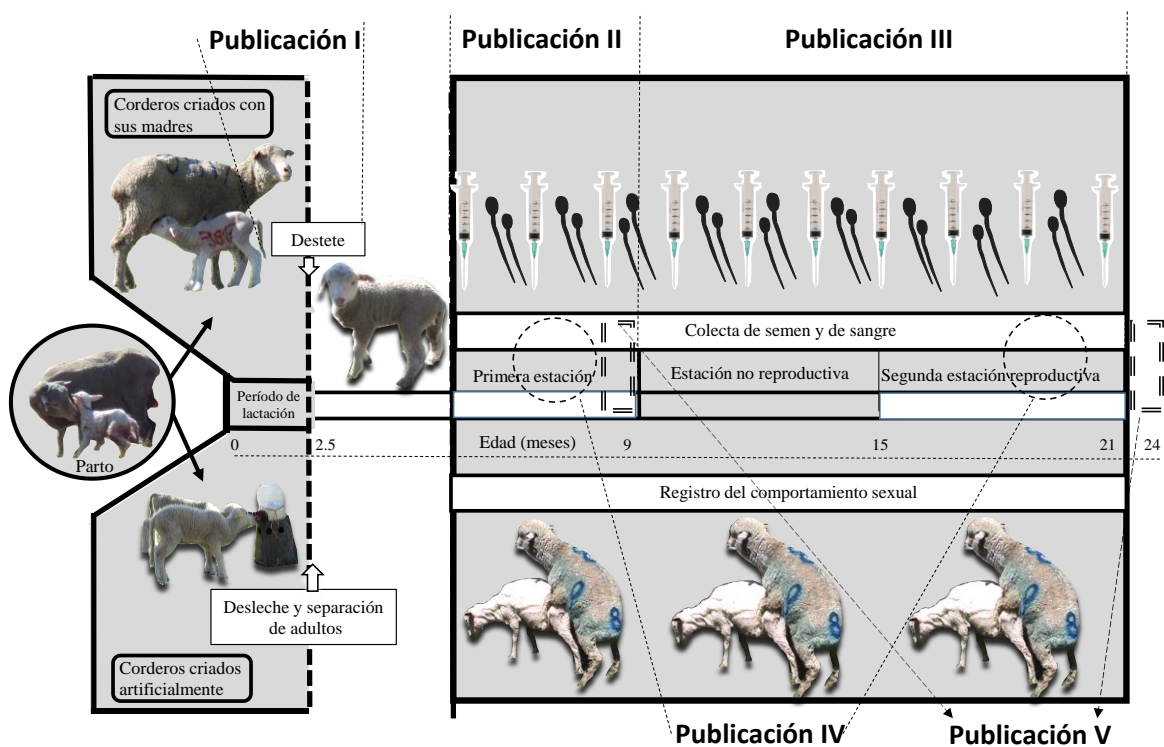


Figura 1. Línea de tiempo (edad de los animales) de los experimentos realizados en la tesis y las publicaciones correspondientes.

4.2.1 Publicación I

El día del destete se consideró como el Día 0. Se realizaron registros de comportamiento individual de los corderos mediante un muestreo instantáneo (scan) cada 10 min de 08:00 a 11:00 h y de 17:00 a 20:00 h, desde el Día -3 al Día 4. Los comportamientos registrados fueron: echados, parados, caminando, pastando, estando bajo la sombra, tomando agua, jugando con objetos y costeano. Las vocalizaciones fueron registradas durante un período de 30 s cada 10 min usando un muestreo 0/1 (Lehner, 1996).

4.2.2 Publicaciones II y III

Se registró el peso corporal, la circunferencia escrotal y el comportamiento sexual fueron determinados cada 2 o 3 semanas desde las 9 hasta las 90 semanas de edad de los corderos. Se colectó semen por electroeyaculación y se determinaron las principales variables del espermiograma normal. Se consideró que los corderos llegaron a la pubertad cuando eyacularon al menos (o un mínimo de) 50×10^6 espermias siendo más del 10% motiles. Se realizaron tests de comportamiento sexual con una oveja en celo registrando los principales comportamientos sexuales durante 20 min. Se colectaron muestras de sangre para medición de la concentración sérica de testosterona durante todo el período experimental.

Cuando los corderos tuvieron 40 semanas de edad (al final de la primera estación reproductiva) se les realizó un desafío de GnRH (Publicación II). Se utilizaron dos dosis de acetato de busrelina y se midió la respuesta de testosterona durante 7 h.

4.2.3 Publicación IV

Este estudio se realizó cuando los animales se encontraron en la primera (abril 2012) y segunda estación reproductiva (abril 2013), con 8 y 20 meses de edad, respectivamente. Los carneros de cada grupo fueron sometidos a tests no competitivos (tests individuales: un carnero con una oveja en celo) y una semana después a tests competitivos (dos carneros ubicados en el mismo corral con una oveja en celo). En los tests competitivos, un macho de cada uno de los grupos (pareados de acuerdo al peso corporal) fueron introducidos simultáneamente en el corral. Ambos tipos de tests fueron realizados en los mismos corrales usados en los tests de comportamiento sexual individual con una oveja en celo registrando

las mismas variables también durante 20 min. Se colectaron muestras de sangre para determinar las concentraciones de testosterona y cortisol.

4.2.4 Publicación V

Se realizó un test de aislamiento social (open field test) a 10 corderos de cada grupo a los 8 meses de edad. El test de aislamiento social consistió en colocar a cada animal durante 10 min sin que tuviera interacción visual, olfativa o auditiva con otros animales ni con humanos. Durante los tests se registraron los siguientes comportamientos: locomoción (números de líneas cruzadas), vocalizaciones, eliminaciones (defecaciones + micciones), olfateos, intentos de escape e inmovilizaciones. Se registró la frecuencia cardíaca, la temperatura rectal y la frecuencia respiratoria, y se colectaron muestras de sangre para medir la concentración de cortisol y la concentración de proteínas totales y albúmina en suero.

Se realizó un desafío con ACTH cuando los carneros tuvieron 2 años de edad. Se administró 50 UI de ACTH a 10 carneros de cada grupo y se midió la respuesta de cortisol hasta las 6 h.

4.3 *Análisis Estadísticos*

Las variables registradas o medidas en más de un tiempo fueron analizadas por el modelo mixto de SAS (2003; SAS Institute, Cary, NC, USA). El modelo consideró el grupo (CA o CM: Publicación I, II, III y V) o el tipo de test sexual (competitivo o no competitivo: Publicación IV), el tiempo y la interacción entre ellos como efectos fijos, y el carnero dentro de cada grupo como efecto aleatorio. Comparaciones múltiples post hoc fueron realizadas con la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD).

La edad a la pubertad y la edad a la que los corderos llegaron al valor máximo de la circunferencia escrotal fueron comparadas por ANOVA (Publicación II).

El número de cada uno de los comportamientos sexuales en los tests competitivos y no competitivos dentro de cada grupo de carneros (CA o CM) fue comparado por el test de Wilcoxon (Publicación IV). El número de cada uno de los comportamientos registrados durante el test de aislamiento social fueron comparados entre grupos (CA vs. CM) con el test de Mann-Whitney (Publicación V).

Los resultados fueron considerados significantes con un alpha de 0,05, y los datos son presentados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

5. Resultados

5.1 Publicación I: Respuesta comportamental de los corderos al destete o desleche

No hubo diferencias en la evolución del peso corporal entre los corderos CA y CM durante las primeras semanas de edad, ni tampoco hubo diferencias significativas en la ganancia de peso corporal desde el día -4 (antes del destete) y el día 5 (posterior al destete). Luego del destete, los corderos CM costearon y vocalizaron, caminaron y estuvieron bajo la sombra más frecuentemente que los corderos CA.

5.2 Publicación II: Desarrollo reproductivo y comportamiento sexual de corderos criados por sus madres o criados artificialmente

Los corderos CM tendieron a llegar antes a la pubertad y a su valor máximo de circunferencia escrotal que los CA. Los corderos CM realizaron más acercamientos laterales e intentos de monta que los CA, y en las semanas 32 y 39 los corderos CM presentaron más montas que los CA. Los corderos CA tuvieron mayor concentración sérica de testosterona a las 3,5 y 4 h posteriores al desafío con dosis baja de GnRH que los CM, mientras que a la dosis alta no se encontraron diferencias entre grupos.

5.3 Publicación III: Comportamiento sexual de carneros adultos criados por sus madres o criados artificialmente

Durante la estación no reproductiva los carneros CA desplegaron menos olfateos ano-genitales y montas que los CM. Durante la estación reproductiva los carneros CA desplegaron menos olfateos ano-genitales, flehmen, intentos de monta, y tendieron a montar menos veces que los CM.

5.4 Publicación IV: Competencia por ovejas en celo entre carneros criados por sus madres o criados artificialmente: efecto sobre el comportamiento sexual y la respuesta de testosterona y cortisol

Durante la primera estación reproductiva, la frecuencia de algunos comportamientos sexuales de cortejo disminuyó (flehmen en CM y CA, y olfateos ano-genitales en carneros CM) y algunos comportamientos sexuales de cópula aumentaron (montas con eyaculación y eyaculación/montas totales en carneros CM y montas totales en carneros CA) en los tests de competencia. Durante la segunda estación reproductiva la competencia causó una disminución en la frecuencia de todos los comportamientos evaluados (salvo flehmen) en los carneros CA, pero solo una disminución en los de cópula en los CM. Durante la segunda estación reproductiva la concentración sérica de testosterona a los 60 min fue mayor en los tests no competitivos que en los competitivos en los carneros CA, mientras que en los carneros CM las concentraciones séricas de testosterona tendieron a ser menor en los tests competitivos que en los no competitivos.

5.5 Publicación V: Estrés del aislamiento social y desafío con ACTH en carneros criados por sus madres o criados artificialmente

Los corderos CM presentaron mayor número de eliminaciones totales y de líneas cruzadas, de concentración sérica de albúmina a los 30 min y de concentración sérica de albúmina y proteína total a los 60 min del test de aislamiento social que los CA. Los corderos CM también presentaron menor concentración sérica de globulinas a los 30 min del test de aislamiento social que los CA.

Los carneros CM tuvieron mayor concentración sérica de cortisol a los 150 y 180 min de la administración de ACTH que los CA.

6. Discusión general

Considerando el conjunto de resultados se demostró que la madre durante la lactación juega un rol clave en el comportamiento social de la cría a corto y a largo plazo. El efecto de la madre durante la lactación se evidenció por un adelanto en el desarrollo reproductivo (Publicación II) y por un mayor despliegue de comportamientos sexuales hasta la edad adulta de los carneros (Publicación III), e incluso en condiciones de competencia social (Publicación IV). Por lo tanto, la madre no sólo participa en la alimentación y cuidado, aumentando las probabilidades de que sobreviva y promoviendo el crecimiento de la misma (Kendrick et al., 1997; Nowak et al., 2000, 2011; Dwyer, 2014), sino que también influye directamente en el éxito reproductivo de los carneros.

El efecto de la madre durante la lactación se pudo demostrar en esta tesis al trabajar y comparar dos grupos de carneros, uno criado con sus madres y otro criado artificialmente en ausencia de las mismas, a los que se les realizó un seguimiento continuo a lo largo de 2 años de vida. Dado que los corderos criados por sus madres desplegaron mayor respuesta de estrés al destete que aquellos criados artificialmente (Publicación I), se resalta la importancia de la madre para el cordero y por tanto que hasta esa edad hubo un fuerte vínculo entre ellos. Este efecto se evidenció principalmente por el comportamiento de costear y el incremento en la frecuencia de vocalizar y caminar en los corderos CM (Publicación I). Estos cambios de comportamiento al destete podrían indicar que los corderos CM intentaron buscar a sus madres, reforzando lo sugerido por Napolitano et al., (2008) y Newberry y Swanson (2008). Se evitaron otras fuentes de influencia social manteniendo a los corderos CA con ovejas adultas y con cría al pie durante el período de lactación, y se controló la influencia de la leche y la alimentación al proveer a los corderos leche de oveja en tetinas artificiales y el acceso al mismo alimento. El contacto del personal con los corderos CA fue el mínimo necesario para que ellos pudieran enseñarles a succionar desde las tetinas artificiales durante los primeros días de vida. Además, no hubo diferencias de peso corporal entre los corderos criados con sus madres y los criados artificialmente durante el proceso de lactación ni durante todo el período experimental hasta la edad adulta de los animales. Luego de este período de lactancia, ambos grupos fueron mantenidos bajo similares condiciones durante todo el período experimental. Por lo tanto, las diferencias encontradas en el comportamiento

social y en la fisiología reproductiva están vinculadas directamente a la presencia de la madre.

El efecto maternal durante la lactancia afectó la motivación sexual frente a hembras en celo, lo que se evidenció a lo largo del desarrollo de los corderos (Publicación II), en la etapa adulta de los carneros (Publicación III), y en condiciones de competencia social (Publicación IV). Estos resultados expanden a ovinos la información disponible en roedores (Moore, 1984, 1992; Brike et al., 1987; Rhees et al., 2001), mostrando que la presencia de la madre durante la lactancia mejora la actividad sexual de los machos. En roedores, el comportamiento maternal del lamido de la cría durante el proceso de lactación explica los efectos positivos sobre el comportamiento sexual que los machos exhiben de adultos (Moore, 1984, 1992). Sin embargo, como el lamido maternal tiene un rol marginal en el establecimiento en el vínculo madre-cría (Levy y Poindron, 1987; Vázquez et al., 2015), probablemente sean otras las señales maternas involucradas en el desarrollo sexual de los corderos.

Considerando que las ovejas tienen una gran variabilidad en su comportamiento maternal (Nowak et al., 2000; Dwyer, 2014), y que la presencia y vínculo de la madre durante la lactación afecta el comportamiento sexual de los carneros (Publicación II, III y IV), se plantea como hipótesis que la habilidad maternal de diferentes ovejas puede influenciar la habilidad o despliegue sexual de sus crías. Además, el comportamiento sexual de los carneros tiene una gran variabilidad (Lindsay, 1996; Katz, 2008), teniendo una gran influencia en la tasa de preñez de las majadas (Matos y Thomas, 1992; Perkins et al., 1992). Por lo tanto, las diferencias en el comportamiento maternal durante la lactación pueden contribuir a explicar la variabilidad en el comportamiento sexual de los carneros (Lindsay, 1996; Katz, 2008) y su posible impacto sobre la reproducción.

La presencia y vínculo con la madre durante la lactación no sólo determinó una mejor actividad sexual, sino que además afectó el comportamiento social, por que los mismos animales respondieron en forma diferente a diferentes estresores sociales. Los carneros CM presentaron una respuesta de estrés similar en los tests sexuales individuales y en los test en competencia por una hembra en celo que los CA. A pesar de que no hubo diferencia en la respuesta de cortisol, el comportamiento sexual y la respuesta de testosterona de los carneros CM fue menos afectada por la competencia en los tests sexuales que los CA (Publicación

IV). Sin embargo, los carneros CM presentaron mayor respuesta de estrés al aislamiento social que los CA (Publicación V). Esto refuerza el concepto desarrollado por Pacák et al. (1998) y Moberg (2000), en relación a que la respuesta de estrés no es necesariamente la misma frente a distintos tipos de estresores. La diferente respuesta de los carneros a estos estresores sociales podría estar asociada a diferencias en la motivación social. El hecho de que los carneros CM hayan sido menos afectados por la competencia en los tests sexuales sugiere que estos carneros tuvieron una mayor motivación sexual por las hembras en celo que los CA (Publicación IV). Esta mayor motivación sexual en los carneros CM también está asociado a una mayor motivación en los tests sexuales individuales desde el desarrollo hasta la etapa adulta (Publicación II y III). En relación al estrés del aislamiento social, el hecho de que los carneros CM presentaron mayor respuesta de estrés que los CA (Publicación V) coincide y confirma lo reportado por Romeyer et al. (1992) y Vandenhede et al. (1993). La mayor respuesta de estrés al aislamiento social de los carneros CM podría ser explicada por una mayor dependencia social de su grupo, y por tanto una mayor motivación a reunirse nuevamente con los integrantes del mismo. Es importante resaltar que el contacto con la madre influyó en el comportamiento social de los carneros varios meses luego del destete. Es decir, que la presencia de la madre durante los primeros meses de vida genera una fuerte impronta social en el cordero que condiciona las relaciones sociales futuras. En base a estos resultados se evidencia que la presencia de la madre afecta cómo los carneros se relacionan y responden en nuevos ambientes sociales.

La presencia de la madre no afectó otros parámetros reproductivos estudiados, como la circunferencia escrotal, las concentraciones séricas de testosterona o las variables seminales durante la vida adulta (Publicación III). Aunque hubo algunas diferencias antes de la pubertad, por ejemplo, en el índice gonado-somático (Publicación II), las mismas desaparecieron cuando los carneros llegaron a la etapa adulta (Publicación III). Lo mismo sucedió cuando se estudiaron otros factores sociales que afectaron el comportamiento reproductivo de los corderos. Por ejemplo, los corderos criados en contacto con hembras tuvieron un mayor despliegue del comportamiento sexual que aquellos criados sin hembras, pero no hubo efecto en los parámetros seminales de los carneros (Le Roux y Barnard, 1974; Zenchak y Anderson, 1980). En roedores se observaron resultados similares. La falta de la madre durante el período de lactancia no afectó la producción seminal en ratas macho adultas (Lau et al., 1996). Por lo tanto, la presencia y vínculo de la madre durante la lactación afecta principalmente al comportamiento sexual y social de los carneros, pero no a otros aspectos

de la fisiología reproductiva, al menos de la forma y frecuencia en que fueron determinados en esta tesis.

7. Conclusiones

7.1 Conclusión general

La presencia y vínculo con la madre durante la lactación influyó positivamente en el comportamiento sexual de los carneros, tanto en forma individual como en competencia con otros individuos, e influyó positivamente en el gregarismo, tal como se demostró en la respuesta al aislamiento social.

7.2 Conclusiones específicas

La presencia y vínculo con la madre durante la lactación:

- 7.2.1 fue un factor clave y central en la respuesta comportamental del cordero al estrés del destete.
- 2.2.2 influyó positivamente el comportamiento sexual durante el desarrollo y la etapa adulta de los carneros
- 2.2.3 influyó positivamente en la actividad sexual y evito cambios en la concentración sérica de testosterona de los carneros en competencia por una hembra en celo.
- 2.2.4 contribuyó a una mayor respuesta de estrés al aislamiento social y al desafío con ACTH, pero no afectó la respuesta de estrés en los tests sexuales individuales y en competencia por una hembra en celo.

8. Referencias

- Alexander G. 1977. Role of auditory and visual cues in mutual recognition between ewes and lambs in merino sheep. *Applied Animal Ethology*, 3:65-81.
- Alexander G. 1978. Odour, and the recognition of lambs by merino ewes. *Applied Animal Ethology*, 4:153-138
- Alexander G, Stevens D. 1981. Recognition of washed lambs by merino ewes. *Applied Animal Ethology*, 7:77-86.
- Alexander G, Stevens D, Bradley L. 1990. Distribution of field birth-sites of lambing ewes. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30:759-767.
- Al-Nakib FMS, Lodge GA, Owen JB. 1986. A study of sexual development of ram lambs. *Animal Production*, 43:459-468.
- Arnold GW, Wallace SR, Maller RA. 1979. Some factors involved in natural weaning processes in sheep. *Applied Animal Ethology*, 5:43-59.
- Birke L, Sadler D. 1987. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. *Developmental Psychobiology*, 20:85-99.
- Borg KE, Esbenshade KL, Johnson BH, Lunstra DD, Ford JJ. 1992. Effects of sexual experience, season, and mating stimuli on endocrine concentrations in the adult ram. *Hormones and Behavior*, 26:87-109.
- Brown BW. 1994. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reproduction Nutrition Development*, 34:89-114.
- Casteilla L, Orgeur P, Signoret JP. 1987. Effects of rearing conditions on sexual performance in the ram: practical use. *Applied Animal Behaviour Science*, 19:111-118.
- 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.
- Dwyer CM, Lawrence AB. 2000. Maternal behaviour in domestic sheep (*Ovis Aries*): constancy and change with maternal experience. *Behaviour*, 137:1391-1413.
- Dwyer CM, Lawrence AB. 2005. A review of the behavioural and physiological adaptations of extensively managed breeds of sheep that favour lamb survival. *Applied Animal Behaviour Science*, 92:235-260.
- Dwyer CM. 2014. Maternal behaviour and lamb survival: from neuroendocrinology to practical application. *Animal*, 8:102-112.

- Dýrmundsson ÓR, Lees JL. 1972. Puberal development of Clun Forest ram lambs in relation to time of birth. *The Journal of Agricultural Science*, 79:83-89.
- Enríquez DH, Ungerfeld R, Quintans G, Guidonic AL, Hötzel MJ. 2010. The effects of alternative weaning methods on behaviour in beef calves. *Livestock Production Science*, 128:20-27.
- Fillion TJ, Blass EM. 1986. Infantile experience with suckling odors determines adult sexual behavior in male rats. *Science*, 231:729-731.
- Gonzalez R, Orgeur P, Signoret JP. 1988. Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreeding season. *Theriogenology*, 30:1075-1086.
- Hall FS. 1998. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12: 129-162.
- Hinch GN, Lecrivain E, Lynch JJ, Elwin RL. 1987. Changes in maternal-young associations with increasing age of lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 17:305-318.
- Hinch GN, Lynch JJ, Elwin RL, Green GC. 1990. Long-term associations between Merino ewes and their offspring. *Applied Animal Behaviour Science*, 27:93-103.
- Hofer MA. 1994. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatrica. Suppl*, 87:9-18.
- Hötzel MJ, Quintans G, Ungerfeld R. 2012. Behaviour response to two-step weaning is diminished in beef calves previously submitted to temporary weaning with nose-flap. *Livestock Production Science*, 149:88-95.
- Illius AW, Hayes NB, Lamming GE. 1976. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram in different social environment. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48:25-32.
- 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.
- Katz LS. 2008. Variation in male sexual behavior. *Animal Reproduction Science*, 105:64-71.
- Keller M, Meurisse M, Poindron P, Nowak R, Shayit M, Ferreira G, Lévy F. 2003. Maternal experience influences the establishment of visual/auditory, but not of olfactory recognition of the newborn baby lamb by ewes at parturition. *Developmental Psychobiology*, 43:167-176.

- Kendrick KM, Da Costa AP, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Lévy F, Keverne EB. 1997. Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Research Bulletin*, 44:383-395.
- Kendrick KM, Hinton MR, Atkins K. 1998. Mothers determine sexual preferences. *Nature*, 395:229-230.
- Lacuesta L, Ungerfeld R. 2012. Sexual performance and stress response of previously unknown rams after grouping them in dyads. *Animal Reproduction Science*, 134:158-163.
- Lau C, Klinefelter G, Cameron AM. 1996. Reproductive development and functions in the rat after repeated maternal deprivation stress. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30:298-301.
- Le Roux PJ, Barnard JP. 1974. The effect of heterosexual contact on libido and mating dexterity in Karakul rams. *South African Journal of Animal Science*, 4:171-174.
- Lehner PN. 1996. *Handbook of ethological methods*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH. 1967. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and Behavior*, 2:55-59.
- Levy F, Poindron P. 1987. The importance of amniotic fluids for the establishment of maternal behaviour in experienced and inexperienced ewes. *Animal Behaviour*, 35:1188-1192.
- Lévy F, Porter RH, Kendrick KM, Keverne EB, Romeyer A. 1996. Physiological, sensory, and experiential factors of parental care in sheep. *Advances in the Study of Behavior*, 25:385-422.
- Lévy F, Keller M. 2008. Neurobiology of maternal behavior in sheep. *Advances in the Study of Behavior*, vol. 38. Elsevier Academic Press Inc., San Diego, pp. 399–437.
- Lindsay DR, Dunsmore DG, Williams JD, Syme GJ. 1976. Audience effects on the mating behavior of rams. *Animal Behaviour*, 24:818-821.
- Lindsay DR. 1996. Environment and reproductive behaviour. *Animal Reproduction Science*, 42:1-12.
- Matos CAP, Thomas DL. 1992. Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review. *Livestock Production Science*, 32:1-30.
- Matteri RL, Watson JG, Moberg GP. 1984. Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppresses LHRH-induced LH release in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72:385-393.

- Mirza SN, Provenza FD. 1992. Effects of age and conditions of exposure on maternally-mediated food selection by lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 33:35-42.
- Moberg GP. 1985. Influence of stress on reproduction: measure of well being. In: *Animal Stress* (Ed. by G. P. Moberg), pp. 245-267. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- Moberg GP. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, pp. 1-22. Wallingford, Oxon, UK.
- Moore CL. 1984. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*, 17:347-356.
- Moore CL. 1992. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 662:160-177.
- Napolitano F, De Rosa G, Sevi A. 2008. Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 110:58-72.
- Newberry RC, Swanson JC. 2008. Implications of breaking mother-young social bonds. *Applied Animal Behaviour Science*, 110:3-23.
- Nowak R. 1991. Senses involved in discrimination of merino ewes at close contact and from a distance by their newborn lambs. *Animal Behaviour*, 42:357-366.
- Nowak R, Porter RH, Lévy F, Orgeur P, Schaal B. 2000. Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Reviews of Reproduction*, 5:153-163.
- Nowak R, Poindron P. 2006. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development*, 46:431-446.
- Nowak R, Keller M, Lévy F. 2011. Mother-young relationships in sheep: a model for a multidisciplinary approach of the study of attachment in mammals, *Journal of Neuroendocrinology*, 23:1042-1053.
- Orgeur P, Mavric N, Yvone P, Bernard S, Nowak R, Schaal B, Levy F. 1998. Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and immuno-pathological indicators of welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 58:87-103.
- Pacák K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275:1247-1255.
- Perkins A, Fitzgerald JA, Price EO. 1992. Sexual performance of rams in serving capacity tests predicts success in pen breeding. *Journal of Animal Science*, 70:2722-2725.

- Poindron P, Nowak R, lévy F, Porter RH, Schaal B. 1993. Development of exclusive mother-young bonding in sheep and goats. *Oxford Reviews of Reproductive Biology Journal*, 15:311-364.
- Price EO, Estep DQ, Wallach SJ, Dally MR. 1991. Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *Journal of Animal Science*, 69:1047-1052.
- Price EO, Borgwardt R, Blackshaw JK, Blackshaw A, Dally MR, Erhard H. 1994. Effect of early experience on the sexual performance of yearling rams. *Applied Animal Behavior Science*, 42:41-48.
- Price EO, Borgwardt R, Dally MR. 1996. Heterosexual experience differentially affects the expression of sexual behavior in 6- and 8-month-old ram lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 46:193-199.
- Price EO, Borgwardt RE, Dally MR. 2001. Male-male competition fails to sexually stimulate domestic rams. *Applied Animal Behaviour Science*, 74:217-222.
- Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. 2001. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research*, 123:1-10.
- Romeyer A, Bouissou MF. 1992. Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 34:93-119.
- Schichowski C, Moors E, Gauly M. 2008. Effects of weaning lambs in two stages or by abrupt separation on their behavior and growth rate. *Journal of Animal Science*, 86:220-225.
- Shah A, Oxley G, Lovic V, Fleming A. 2002. Effects of preweaning exposure to novel maternal odors on maternal responsiveness and selectivity in adulthood. *Developmental Psychobiology*, 41:187-196.
- Sharafeldin MA, Kandeel AA. 1971. Post-lambing maternal behaviour. *The Journal of Agricultural Science*, 77:33-36.
- Stellflug JN, Lewis GS. 2007. Effects of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. *Animal Reproduction Science*, 97:295-302.
- Synnott AL, Fulkerson WJ, Lindsay DR. 1981. Sperm output by rams and distribution amongst ewes under conditions of continual mating. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61:355-361.
- Tilbrook AJ, Cameron AWN. 1990. The contribution of the sexual behaviour of rams to successful mating of ewes under field conditions. In: Oldham, C.M., Martin, G.B.,

Purvis, I.W. (Eds.), Reproductive Physiology of Merino Sheep, School of Agriculture. The University of Western Australia, Perth, p. 143–160.

- 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.
- Ungerfeld R, Silva L. 2004. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. *Animal Reproduction Science*, 80:251-259.
- Ungerfeld R, González-Pensado SP. 2008. Social rank affects reproductive development in male lambs. *Animal Reproduction Science*, 109:161-171.
- Ungerfeld R, González-Pensado SP. 2009. Social Dominance and Courtship and Mating Behaviour in Rams in Non-Competitive and Competitive Pen Tests. *Reproduction in Domestic Animals*, 44:44-47.
- Ungerfeld R, Lacuesta L. 2010. Social rank during pre-pubertal development and reproductive performance of adult rams. *Animal Reproduction Science*, 121:101-105.
- Ungerfeld R, Lacuesta L. 2015. Competition between different social ranked rams has similar effects on testosterone and sexual behaviour throughout the year. *Reproduction in Domestic Animals*, 50:1022-1027.
- Vandenheede MI, Bouissou MF. 1993. Sex differences in fear reactions in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 37:39-55.
- Vázquez R, Orihuela A, Flores-Pérez FI, Aguirre V. 2015. Reducing early maternal licking of male lambs (*Ovis aries*) does not impair their sexual behavior in adulthood. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 10:78-82.
- Vince MA, Ward TM. 1984. The responsiveness of newly born Clun forest lambs to odour sources in the ewe. *Behaviour*, 89:117-127.
- Weary DM, Jasper J, Hotzel MJ. 2008. Understanding weaning distress. *Applied Animal Behaviour Science*, 110:24-41.
- Yarney TA, Sanford LM. 1983. The reproductive--endocrine response of adult rams to sexual encounters with estrual ewes is season dependent. *Hormones and Behavior*, 17:169-182.
- Zenchak JJ, Anderson GC. 1980. Sexual performance levels of rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *Journal of Animal Science*, 50:167-174.

9. Anexos



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Postgrados Académicos y Especializaciones

El Tribunal considera que la Tesis de Doctorado del Dr. Juan Pablo Damián representa un trabajo profundo, extenso y sistemático. El manuscrito se encuentra bien estructurado, con hipótesis y objetivos claros, que son respondidos de forma adecuada en base a un diseño experimental sólido. Los resultados son abundantes, originales y relevantes como aporte para el área del conocimiento. El material generado en la investigación tiene potencial para generar nuevas preguntas y experimentos, tanto a nivel básico como aplicado. Dio origen a 5 artículos científicos, 2 de los cuales ya están publicados.

El candidato realizó una excelente exposición oral y defensa de tesis demostrando que tiene un profundo conocimiento del tema y flexibilidad para incorporar puntos de vista complementarios. Respondió solventemente a las distintas preguntas y cuestionamientos.

Por lo anteriormente mencionado, el Tribunal por unanimidad califica el presente trabajo de Tesis de Doctorado: **“Desarrollo reproductivo, comportamiento sexual y respuesta de estrés de carneros que fueron criados artificialmente o por sus madres”** como Aprobado con Mención.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alejandro Bielli".

Dr. Alejandro Bielli
Presidente del Tribunal