UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

“EFECTOS DEL DESTETE SOBRE EL VÍNCULO ENTRE CORDEROS MELLIZOS”

POR

GONZALEZ ROSA, Ana Cecilia

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
2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: Dr. Fabio Henrique

Segundo miembro (Tutor): Dra. Daniela Casuriaga

Tercer miembro: Dr. Mauro Minteguiaga

Cuarto miembro: Dr. Rodolfo Ungerfeld

Quinto miembro: Dra. Aline Freitas de Melo

Fecha: 20 de Diciembre de 2023

Autores: Br. Ana Cecilia Gonzalez

AGRADECIMIENTOS

Le quiero agradecer a Daniela, mi tutora, por la dedicación, guiarme y apoyarme para la elaboración de este trabajo. A los cotutores Aline Freitas de Melo y Rodolfo Ungerfeld por sus participaciones y experiencia. Agradecer también a la Facultad de Veterinaria, profesores y compañeros que durante la carrera nos brindaron sus conocimientos y contribuyeron en la formación como profesional. A la Estación Experimental Las Brujas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) agradecer por su disponibilidad y ayuda en la parte experimental de la tesis. Finalizando quiero dedicarle este trabajo y agradecerle a mi familia por el apoyo incondicional y ser el pilar fundamental durante estos años.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN ……2

AGRADECIMIENTOS ……3

LISTA DE CUADRO Y FIGURA……...5

RESUMEN……6

SUMMARY……...7

1 INTRODUCCIÓN..... 8
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 10
2.1 Relaciones sociales en la cría ovina..... 10
2.1.1 Vínculo madre-cría..... 11
2.1.2 Vínculo entre corderos mellizos..... 12
2.2 Evaluación del vínculo social en ovinos..... 13
2.3 Destete artificial y reorganización social..... 14
3 HIPOTESIS..... 15
4 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS..... 16
4.1 Objetivo general..... 16
4.2 Objetivos específicos..... 16
5 MATERIALES Y MÉTODOS..... 17
5.1 Local de Estudio, animales y manejo..... 17
5.2 Distancia entre corderos mellizos: fotos aéreas y mediciones de distancia..... 17
5.2.1 Área de observación..... 17
5.2.2 Análisis de imágenes..... 18
5.3 Comportamientos..... 20
5.4 Análisis estadístico..... 20
6 RESULTADOS..... 21
6.1 Distancia entre hermanos vs otros corderos del grupo en el tiempo..... 21
6.2 Respuesta comportamental..... 22
7 DISCUSIÓN..... 24
8 CONCLUSIÓN..... 26
BIBLIOGRAFIA..... 27

LISTAS DE CUADROS Y FIGURA

Páginas

Figura 1. Foto aérea superpuesta de la totalidad del potrero de observación y foto aérea con zoom que refleja la muestra de la realización de las mediciones. 19

Figura 2. Distancia entre los hermanos y la distancia promedio entre cada mellizo y los otros corderos del grupo en el tiempo desde los 94-96 a los 99 días posparto. 21

Figura 3. Porcentaje de observaciones en las que los corderos estuvieron parados, echados, caminando, pastando, rumiando y vocalizando en el tiempo desde el Día 94-96 al Día 99 posparto. 23

RESUMEN

En ovinos, el primer vínculo social y el más fuerte que se establece luego del parto es el vínculo entre la madre y su/s cordero/s, y en caso de partos múltiples, el vínculo entre hermanos es el segundo más intenso. El destete abrupto es la separación del cordero de su madre, implicando la ruptura del vínculo de la díada. En el caso de corderos mellizos, normalmente los hermanos son mantenidos en el mismo grupo social. La separación de la madre al destete impone cambios sociales en el grupo de animales, ya que el mismo pasa a estar conformado sólo por corderos, desencadenando cambios comportamentales en los animales. El objetivo general de esta tesis fue determinar si la intensidad del vínculo entre corderos mellizos se modifica luego de la separación definitiva de la madre durante el destete artificial. Los objetivos específicos de esta tesis fueron: (1) determinar si la relación entre la distancia que mantienen los corderos mellizos entre sí y la distancia que mantienen de otros corderos de la majada se modifica luego de la separación definitiva de la madre durante el destete artificial; y (2) determinar los cambios comportamentales al destete. El estudio se realizó en la Estación Experimental Las Brujas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Se utilizaron 20 ovejas multíparas y sus respectivos corderos mellizos (11 ovejas Milchschaf y sus corderos y 9 ovejas Finish Landrace y sus corderos). A los 90 días de edad se llevó a cabo el destete artificial, separando las ovejas de sus corderos en potreros diferentes, impidiendo el contacto visual, auditivo y olfatorio con su madre. Se tomaron fotografías aéreas del grupo con un drone (DJI Mavic Air 2, Guangdong, China), desde 3 días antes (desde los 94 a los 96 días de edad) hasta 1 día después del destete artificial [a los 98 (destete) y 99 días de edad]. Las fotografías se tomaron cada 20 min durante 2 h por la mañana (07:00 h a 09:00 h) y 2 h por la tarde (17:00 h a 19:00 h), totalizando 14 fotografías / día. Se midió las distancias entre todos los corderos del grupo mediante Photoshop. A su vez se registraron los comportamientos de parado, echado, caminando, pastando, rumiando y vocalizando. La distancia entre hermanos fue menor que el promedio de la distancia hacia los otros corderos del grupo (hermanos: 9,2 m ± 0,8 m vs promedio de la distancia de cada mellizo a los otros corderos del grupo: 16,4 m ± 0,8 m, $P < 0,0001$). Estas distancias variaron en el tiempo ($P < 0,0001$). Tanto la distancia entre hermanos, como la distancia promedio entre cada mellizo y los otros corderos del grupo disminuyó desde los 3 días previos al destete hasta el día del mismo ($P < 0,0001$). Ambas distancias aumentaron desde los 98 a los 99 días de edad ($P < 0,0001$). En todo el periodo, la distancia entre hermanos fue menor que el promedio de la distancia de cada mellizo en relación a los otros corderos del grupo ($P < 0,0001$). Todos los comportamientos cambiaron con el tiempo ($P < 0,0001$, para todos). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estaban parados y pastando disminuyó desde los 94-96 a los 98 días de edad ($P < 0,0001$, para ambos), aumentando desde los 98 a los 99 días de edad ($P < 0,0001$, para ambos). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estaban echados, rumiando, caminando y vocalizando aumento desde los 94-96 a los 98 días de edad ($P < 0,0001$, para todos), disminuyendo desde los 98 a los 99 días de edad ($P < 0,0001$, para todos). En conclusión, los corderos mellizos presentan un vínculo preferencial entre sí, cuya intensidad aumenta cuando son separados definitivamente de su madre, quedando en evidencia que la madre influye en la manifestación de este vínculo.

SUMMARY

In sheep, the first and strongest social bond established after birth is the bond between the mother and its lamb(s). In twin-born lambs, the social bond between siblings is the second strongest relationship establish in a lambs' life. Abrupt weaning involves the separation of the lamb from its mother, breaking abruptly the bond of the dyad. After weaning, the siblings normally stayed in the same social group. Separation from the mother at weaning involves changes in the social environment, triggering behavioral changes in the animals. The general objective of this Thesis was to determine if the intensity of the bond between twin lambs changes after definitive separation from the mother during artificial weaning. The specific objectives of this Thesis were: (1) to determine if the relationship between the distance that twin lambs maintain from each other and the distance they maintain from other lambs in the flock is modified after definitive separation from the mother during artificial weaning; and (2) determine the behavioral changes at weaning. The study was performed at the Las Brujas Experimental Station of the National Agricultural Research Institute (INIA) with 20 multiparous ewes and their respective twin lambs were used (11 Milchschaf ewes and their lambs and 9 Finish Landrace ewes and their lambs). Abrupt weaning was performed at 90 days of age, by separating the ewes from their lambs in different paddocks, where they had no visual, auditory and olfactory contact among them. Aerial pictures were taken with a drone (DJI Mavic Air 2, Guangdong, China), from 3 days before (from 94 to 96 days of age) to 1 day after artificial weaning [at 98 (weaning) and 99 days of age]. Pictures were taken every 20 min for 2 hours in the morning (07:00 to 09:00) and 2 hours in the afternoon (17:00 to 19:00), totaling 14 photographs/day. The distances between all the lambs in the group were measured using Photoshop. Lambs' behaviors (standing up, lying down, walking, grazing, and ruminating) were recorded at the same period of the day that the pictures were taken. The siblings were closer to each other than to the other lambs of the group (siblings: 9.2 m ± 0.8 m vs. average distance of each twin to the other lambs in the group: 16.4 m ± 0.8 m, $P < 0.0001$). These distances varied over time ($P < 0.0001$). Both, the distance between siblings and the average distance between each twin and the other lambs in the group decreased from the 3 days before weaning to the day of weaning ($P <0.0001$). Both distances increased from 98 to 99 days of age ($P < 0.0001$). At all points, the siblings were closer to each other than to the other lambs of the group ($P <0.0001$). All behaviors changed with time ($P < 0.0001$, for all). The percentage of observations in which lambs were standing and grazing decreased from 94-96 to 98 days of age ($P < 0.0001$, for both), increasing from 98 to 99 days of age ($P <0.0001$, for both). The percentage of observations in which lambs were lying down, ruminating, walking and vocalizing increased from 94-96 to 98 days of age ($P < 0.0001$, for all), decreasing from 98 to 99 days of age ($P < 0.0001$, for all). In conclusion, twin lambs had a preferential social bond to each other, increasing when they are definitively separated from their mother, indicating that the mother influences on its bond.

1 INTRODUCCIÓN

Los ovinos son una especie social y gregaria que tienen la capacidad de reconocimiento individual y de generar memoria social, por lo que pueden establecer vínculos sociales que perduran en el tiempo (Estévez, Andersen & Nævdal, 2007, Kendrick, 2008). En esta especie, el primer vínculo social y el más fuerte se establece es entre la madre y su/s cordero/s al parto (Veissier Boissy, Nowak, Orgeur y Poindron, 1998). En caso de partos múltiples, el vínculo entre hermanos se considera el segundo más intenso (Walser, Hague y Yeomans, 1985). El vínculo madre-cría se establece en las primeras horas posparto, y del correcto establecimiento de este vínculo va a depender la supervivencia de la cría (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). El vínculo madre-cría cambia a lo largo de la lactancia, a medida que el cordero crece (Napolitano, De Rosa y Sevi, 2008) y gana progresivamente independencia nutricional y social de su madre. Este vínculo finaliza con el destete natural, el que en ovinos silvestres ocurre entre los 6 y los 12 meses de edad de los corderos (Grubb, 1974). A pesar de que, en corderos mellizos, el vínculo con el hermano es el segundo en establecerse (Veissier, Boissy, Nowak, Orgeur y Poindron, 1998), la información respecto a las características de este vínculo es aún muy escasa. El vínculo entre los corderos mellizos se establece tempranamente, ya que los hermanos pueden reconocerse mutuamente a partir del séptimo día de edad (Walser et al., 1981, Nowak, 1990). La presencia de la madre es necesaria para que ese vínculo se establezca, ya que favorece el acercamiento entre los hermanos (Ligout, et al., 2004). Los primeros trabajos respecto al estudio del vínculo entre corderos mellizos se centraron en las diferentes señales presentes en el reconocimiento entre los hermanos durante el primer mes de vida (Ligout et al., 2004; Ligout y Porter, 2003; Nowak et al., 1990). A su vez, se observó que corderos mellizos de entre 7 y 28 días de edad (Abecia et al. 2022, Ozella et al. 2022) y de 6-7 semanas de edad (Walser, Hague y Walters 1981) pasan más tiempo con su hermano que con el resto de los animales del grupo, reafirmando la relación que existe entre los hermanos. Esta mayor asociación entre corderos mellizos se observa incluso en periodos de en los que la madre no está presente, concordando con lo reportado previamente (Casuriaga, Ungerfeld, Ciappesoni y Freitas-de-Melo, 2022; Walser et al., 1981). Por lo tanto, los resultados son concluyentes respecto a la existencia del vínculo social entre hermanos. Sin embargo, la influencia de la madre en el mantenimiento del vínculo entre hermanos durante su desarrollo no está bien estudiada.

El destete artificial, es la separación del cordero de su madre, antes que ocurra el destete natural, realizándose este método frecuentemente de forma abrupta. Esta práctica desencadena una respuesta de estrés elevada tanto en la madre como en la cría (Napolitano et al., 2008). La separación de la madre al destete impone cambios sociales en el grupo de animales, ya que el mismo pasa a estar conformado sólo por corderos y los corderos pierden su principal referente social que es su madre (Weary, Jasper, Hötzel, 2008). Por lo tanto, las relaciones sociales de los corderos deben reorganizarse luego del destete, lo que incluye un aumento de la sincronización de las actividades y los encuentros sociales entre los pares (Veissier et al., 1998). Los corderos presentan una mayor motivación por estar más cerca de sus compañeros sociales y comienzan a investigar su entorno en compañía de sus hermanos (Veissier et al., 1998). Algunos trabajos demuestran que los hermanos continúan presentando vínculos preferenciales luego del destete, aunque la información al respecto es limitada (Walser et al., 1986, Casuriaga et al 2022). Esto indica que el reconocimiento

y el vínculo entre los mellizos no depende solamente de la presencia de la madre. Debido a los grandes cambios sociales que ocurren como consecuencia del destete, es esperable que los vínculos sociales que se establecieron en presencia de la madre también presenten cambios luego del mismo.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Relaciones sociales en la cría ovina

En ovinos de cría, luego del parto, el grupo está conformado por ovejas lactantes y de crías conviviendo juntas. Estar en la majada implica formar y mantener vínculos sociales a partir del reconocimiento entre individuos. El vínculo entre la madre y su/s cordero/s es el primer y más fuerte vínculo social que se establece en ovinos (Veissier et al.,1998). En caso de partos múltiples, el vínculo entre hermanos se considera el segundo más intenso (Walser et al., 1985). El reconocimiento entre estos individuos está basado en señales olfativas, visuales y auditivas. El reconocimiento mediante señales olfativas tiene importancia a distancias cortas, menores a medio metro de distancia (Kendrick, 2008). Por ejemplo, estas señales son fundamentales para que la madre reconozca a la cría durante las primeras horas posparto. A pesar de la importancia de las señales olfativas en el reconocimiento entre individuos, las ovejas privadas del olfato pueden reconocer a individuos con los que había sido previamente familiarizados por medio de otros sentidos como la visión y la audición (Kendrick et al., 2008). Las ovejas pueden diferenciar caras de ovejas conocidas de las de ovejas desconocidas y recordarlas por años, demostrando la capacidad de desarrollar memoria social (Kendrick, 2008). En lo que respecta al reconocimiento mediante señales auditivas, se ha reportado que las ovejas son sensibles a sonidos nuevos y aprenden a reconocer las vocalizaciones de sus corderos en un periodo de tiempo corto luego del nacimiento (Keller et al., 2003). Además de permitir el reconocimiento entre individuos, las señales olfativas, visuales y auditivas también cumplen importantes funciones en la comunicación entre los mismos, mejorando su capacidad de respuesta a las condiciones del medio. Por ejemplo, las ovejas comunican su estado emocional modificando las frecuencias de sonidos emitidos por sus vocalizaciones. Kendrick et al (2008) propusieron que un animal puede influir sobre el estado emocional de otro animal a través de las vocalizaciones, especialmente en el caso de individuos que presentan un vínculo social entre sí. Los corderos mellizos que presentan un vínculo preferencial entre sí y que son separados de sus madres y alojados juntos luego del destete, vocalizan más que aquellos que fueron alojados junto a otros individuos del grupo (Casuriaga et al., 2022), indicando que la respuesta de estrés se amplifica en presencia del hermano. Los autores sugieren que esto podría deberse a un mayor contagio emocional entre los corderos mellizos, en relación a otros corderos del grupo. En conclusión, los ovinos pueden reconocer a los individuos de su grupo, son conscientes de la presencia y del estado emocional de sus pares, lo que influye en la respuesta que expresan al entorno y en su bienestar.

En una majada de ovinos los animales mantienen determinadas relaciones espaciales entre sí, que pueden mantenerse o no a lo largo del tiempo. El espaciamiento se puede caracterizar a través de dos tipos de medidas: la distancia mínima y la máxima observada entre dos individuos del grupo (Dwyer et al., 2008). La primera, mide el grado de tolerancia entre individuos, y la segunda aporta información respecto al grado de cohesión del rebaño (Dwyer et al., 2008). Los resultados de Ozella et al. (2020) demuestran que las relaciones espaciales entre los ovinos no son aleatorias, habiendo factores que influyen en las interacciones entre animales. Entre estos factores se encuentran la edad (Lawrence, 1990; Doyle et al., 2016), el estado reproductivo (Norton et al., 2012), el estado emocional (Michelena et al., 2008; Doyle et al., 2016), las características del ambiente como la disponibilidad de alimento y la temperatura (Ozella et al., 2020). En este trabajo se reportó que las ovejas de edad

similar interactuaron con más frecuencia entre sí que con aquellas ovejas de edades diferentes. El estado reproductivo de los animales también influye en las relaciones espaciales que se mantienen entre los mismos. Por ejemplo, a medida que se acerca el parto las ovejas tienden a alejarse de la majada aumentando su distancia en relación a otros individuos, lo que promueve la interacción con el recién nacido, favoreciendo el establecimiento del vínculo madre-cría (Dwyer et al., 2008). Por otro lado, estresores como el destete provocan cambios en las dinámicas sociales, pudiendo disminuir las distancias entre animales debido a un efecto de cohesión del grupo (Dwyer et al., 2008). Los factores medioambientales y climáticos también juegan un rol en el reagrupamiento de individuos dentro de una majada. Ozella et al. (2020) registró que cuando disminuye la temperatura o hay mucho viento, los individuos tienden a agruparse para sobrellevar el malestar térmico. Además, la existencia de vínculos sociales entre los animales también influye en las relaciones espaciales entre los mismos, observándose que los individuos que presentan mayor vínculo permanecen más cercanos entre sí (Abecia et al., 2022).

2.1.1 Vínculo madre-cría

El vínculo madre-cría es fuerte y se establece durante las primeras horas posparto. Este vínculo se caracteriza por la selectividad de la madre hacia sus crías, la que involucra el cuidado y el amamantamiento exclusivo de las mismas y el rechazo a crías ajenas (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016). En el periparto, ocurren cambios endocrinos caracterizados por una disminución de la concentración de progesterona y un aumento de la concentración de estradiol y oxitocina que estimulan el despliegue del comportamiento maternal (Nowak et al., 2011). A su vez, el comportamiento maternal favorece el reconocimiento de la cría. El reconocimiento de la cría se produce dentro de las primeras 2 horas posparto (Nowak et al., 2011) a través de mecanismos sensoriales, como las señales visuales, olfativas y auditivas (Lévy, 2004). El líquido amniótico que recubre a la cría libera compuestos volátiles que atraen la atención de la oveja, la que en respuesta comienza a lamer a su cordero, favoreciendo así el reconocimiento olfativo de la cría (Nowak et al., 2006). Específicamente, la supervivencia de las crías depende de la capacidad para discriminar a sus madres dentro de las primeras 12 horas postparto (Nowak y Lindsay, 1992). El lamido de la madre estimula al cordero a pararse y mamar (Freitas-de-Melo et al., 2022). El tiempo desde el parto al primer amamantamiento depende fundamentalmente del comportamiento materno y del vigor del cordero, estando inversamente relacionado con la supervivencia de la cría (Goursaud y Nowak, 1999). Estos primeros amamantamientos son muy importantes para el correcto establecimiento del vínculo madre-cría, de lo que depende la supervivencia, el crecimiento y desarrollo de la cría y la mayoría de su aprendizaje postnatal (Goursaud y Nowak, 1999).

El vínculo madre-cría cambia a lo largo de la lactancia, a medida que el cordero crece (Napolitano et al., 2008). Al inicio de la lactación, la frecuencia de amamantamientos es alta, existiendo una gran cercanía entre la madre y sus crías (Freitas-de-Melo et al., 2022). Con el crecimiento del cordero los requerimientos nutricionales de la cría, y consecuentemente el costo energético que representa la producción de leche para la oveja aumenta. Debido a esto, la madre impide que su cordero se amamante con la misma frecuencia que al inicio de la lactación (Weary et al., 2008). La disminución del consumo de leche se acompaña de un aumento en el consumo de pasturas por parte del cordero y un aumento del desarrollo ruminal (Weary et al., 2008). Además, aumenta la distancia entre la madre y sus crías, las que también comienzan a estar

más en contacto con otros corderos del grupo (Weary et al., 2008). Por lo tanto, a medida que el cordero crece, gana progresivamente independencia nutricional y social de su madre, hasta finalizar con el destete natural, el que en ovinos silvestres ocurre entre los 6 y los 12 meses de edad de los corderos (Grubb, 1974).

2.1.2 Vínculo entre corderos mellizos

Como se mencionó anteriormente, en corderos mellizos, el vínculo con el hermano es el segundo en establecerse (Veissier, Boissy, Nowak, Orgeur y Poindron, 1998). A pesar de esto, la información respecto a las características del vínculo entre mellizos es aún muy escasa. Los corderos mellizos presentan un vínculo social más intenso entre sí que con otros corderos del grupo, el que se establece tempranamente, pudiendo reconocerse a partir del séptimo día de edad (Walser et al., 1981; Porter et al., 1995,). Ligout, et al. (2004) plantearon que las señales olfatorias son suficientes para el reconocimiento entre corderos mellizos de 4 semanas de edad. Además, los corderos mellizos responden con mayor frecuencia a los balidos de su hermano que a los de un cordero desconocido (Arnold y Pahl,1974; Walser et al., 1981; Walser & Williams, 1986), demostrando que también pueden reconocerse auditivamente.

La presencia de la madre es necesaria para el establecimiento del vínculo entre los mellizos. Los corderos criados por sus madres prefieren a su hermano en relación a otro cordero del grupo, mientras que los criados artificialmente no (Ligout, et al., 2004). Esto podría asociarse al hecho de que la madre amamanta a sus mellizos simultáneamente, favoreciendo tempranamente el acercamiento entre hermanos en mayor medida que con otros corderos (Ligout, et al., 2004). Este contacto temprano que presentan los corderos mellizos criados por sus madres favorece el vínculo entre hermanos aun cuando los mismos son gestados por una misma oveja genéticamente diferente (receptora de los embriones de dichos corderos), demostrando que el desarrollo del vínculo entre los hermanos no está dado por su condición genética, sino más bien por la crianza (Walser et al. 1981). De esta forma, la oveja influye indirectamente en el entorno social de sus crías, contribuyendo primeramente al desarrollo de las preferencias de los mellizos (Ligout, et al., 2004). La intensidad del vínculo entre dos individuos puede depender de la edad con la que se crea el mismo. Bouissou y Andrieu (1977) reportaron que vaquillonas que se mantuvieron juntas desde el nacimiento establecieron vínculos sociales más intensos que aquellas que fueron reagrupadas a los 6 o 12 meses de edad. Esto podría estar indicando que habría una edad más propicia para crear las relaciones preferenciales entre individuos (Bouissou y Andrieu, 1978), lo que posiblemente se asocie a la etapa de aprendizaje social (Veissier et al., 1998).

Los primeros trabajos respecto al estudio del vínculo entre corderos mellizos se centraron en las diferentes señales presentes en el reconocimiento entre los hermanos durante el primer mes de vida (Ligout et al., 2004; Nowak et al., 1990). A su vez, Walser et al. (1981), demostró que los hermanos permanecían más tiempo cerca entre sí cuando tenían 6-7 semanas. Más recientemente, Abecia et al. (2022) demostraron que los corderos mellizos de 1 mes de edad pasaban más tiempo con su hermano que con el resto de los corderos. En el mismo sentido, Ozella et al. (2022) reportaron que los corderos mellizos de 7 a 28 días de edad mostraron una mayor interacción, reafirmando la relación que existe entre los hermanos. Esta mayor asociación entre corderos mellizos se observa incluso en periodos en los que la madre no está presente, concordando con lo reportado previamente (Casuriaga et al., 2022; Walser et al., 1981). Por lo tanto, los resultados son concluyentes respecto a la

existencia del vínculo social entre hermanos. Sin embargo, la influencia de la madre sobre este vínculo aún no está bien estudiada.

2.2 Evaluación del vínculo social en ovinos

En ovinos, existen diferentes formas de evaluar la existencia de un vínculo social entre dos individuos. Algunas de ellas han sido utilizadas para evaluar el vínculo entre corderos mellizos, incluyendo la distancia y la prueba de preferencia (Abecia et al. 2022). Como se mencionó anteriormente, los individuos que mantienen un vínculo preferencial permanecen más próximos entre sí que con otros individuos del grupo. Para comprobar la existencia de un vínculo entre los corderos mellizos Abecia et al. (2022) lo midió la proximidad y distancia calculando el tiempo que pasaban juntos los hermanos y Walser et al. (1981) midió el número de veces que los corderos permanecieron juntos en un área predeterminada. Similarmente, Casuriaga et al. (2022) midieron el número de veces que el hermano fue el cordero más cercano, encontrando que el hermano fue el individuo que se mantuvo más cercano a su mellizo en corderos de 2 meses de edad.

Otra herramienta utilizada para determinar el vínculo entre individuos es el test de preferencia. En este test, se evalúa la preferencia de un individuo por otro, basándose en variables como el tiempo en que demora en acercarse al individuo y el tiempo total que permanece junto a él (Casuriaga et al., 2022). En condiciones de campo los corderos mellizos en compañía de sus madres, están más cercanos entre sí que a los otros corderos del grupo (Casuriaga et al., 2022). Sin embargo, estos mismos animales no mostraron preferencia por su hermano, posiblemente debido a que el estrés generado por la separación momentánea de la madre durante el test de preferencia, fue un factor que interfirió con el comportamiento natural de los corderos. Esto indica que la medición de la distancia entre hermanos podría ser mejor indicador que el test de preferencia para evaluar el vínculo social entre hermanos mellizos antes del destete. La ventaja de utilizar la distancia como indicador de vínculo, es que la misma se mide mientras los animales están desplegando su comportamiento natural, a diferencia de lo que ocurre con el test de preferencia en el que los animales deben ser manipulados. Por otra parte, el test de preferencia podría no ser la mejor opción para evaluar un vínculo en el tiempo ya que habría que repetirlo varias veces, y el aprendizaje de los animales al realizar el test afectaría el resultado.

Otra forma de evaluar vínculo es medir la respuesta de estrés de los animales durante la separación de los individuos que tienen un vínculo, considerando que la intensidad de la respuesta desencadenada está relacionada con la intensidad del vínculo. Para evaluar esta respuesta se puede utilizar la prueba estandarizada de separación-reunión del cordero (Freitas-de-Melo et al., 2018; 2021), o la prueba de aislamiento-reunión-separación. Estas pruebas han sido utilizadas para evaluar el vínculo existente entre la oveja y su cordero, pero no hay reportes de su uso para la evaluación de otro tipo de vínculo. En esta prueba se registran indicadores de estrés, antes y después de la separación de los individuos, entendiéndose que la intensidad de la respuesta de estrés a la separación está asociada a la existencia del vínculo entre ambos individuos. Esto se reafirma, cuando en la misma prueba los individuos se vuelven a juntar observándose una disminución de la respuesta de estrés desencadenada (Freitas-de-Melo et al., 2021). Tomando en cuenta esto, la respuesta de estrés desencadenada en el destete definitivo también podría ser utilizada como forma de evaluar el vínculo, dando indicios de la intensidad del vínculo que presenta el cordero con su madre. Sin embargo, en ese caso, además de la separación

maternal se suman otros estresores, como los cambios nutricionales y sociales, que pueden interferir en la evaluación de respuesta de estrés.

2.3 Destete artificial y reorganización social

El destete artificial es una práctica comúnmente utilizada en los sistemas productivos que se basa en la separación del cordero y su madre antes de que ocurra el destete natural, siendo realizada frecuentemente de manera abrupta. El destete artificial desencadena una respuesta de estrés en la madre y sus corderos cuya intensidad depende en parte de cuán tempranamente se realice (Napolitano et al., 2008). El destete implica una serie cambios que son impuestos a los animales: 1) emocionales, provocados por la finalización del vínculo madre-cría, 2) nutricionales, determinados por el fin de la lactancia y la alimentación exclusiva a base de alimentos sólidos, 3) nuevo ámbito social y físico, ya que el destete usualmente involucra el traslado de los animales hacia un nuevo sitio pudiendo acompañarse del reagrupamiento de animales.

Los cambios de comportamiento relacionados a la respuesta de estrés al destete incluyen el aumento de la frecuencia de las vocalizaciones y del comportamiento costear (Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2016), conductas asociadas con la búsqueda de la madre (Damián, Hötzel, Banchero, Ungerfeld, 2013). Además, se observa que los corderos quedan más tiempo parados y caminan más, disminuyendo el tiempo destinado al descanso y a la alimentación (Freitas-de-Melo et al., 2019). Estos cambios de comportamiento son iniciados rápidamente luego de la separación, disminuyendo su frecuencia a los 2 o 3 días posteriores, ya que los mismos son energéticamente exigentes e ineficientes (Freitas-de-Melo, Banchero, Hötzel, Damián, Ungerfeld, 2013). Si bien los cambios agudos desencadenados por el destete cesan tempranamente, es posible que sus efectos sobre el animal se prolonguen por más tiempo (Freitas-de-Melo et al., 2022).

La separación de la madre al destete impone cambios sociales en el grupo de animales, ya que el grupo pasa a estar conformado solo por corderos y muchas veces hay reagrupamiento con animales desconocidos (Weary, Jasper, Hötzel, 2008). Además, los corderos pierden su principal referente social que es su madre. Por lo tanto, las relaciones sociales de los corderos deben reorganizarse completamente luego del destete. Esta reorganización implica entre otras cosas, el establecimiento de nuevas jerarquías sociales lo que incrementa la inestabilidad social y prolonga el estrés en los animales. Además, durante la lactación es la madre la que establece los patrones rítmicos de comportamientos de sus crías por lo que en su ausencia los corderos deben reestructurar también sus actividades (Panksepp et al., 1998). La alteración de los ritmos de actividades puede ir acompañado con variaciones en los patrones de alimentación y sueño, lo que se acompaña de niveles elevados de glucocorticoides, cambios en la frecuencia cardiaca y temperatura corporal (Cirulli et al., 1996; Koolhaas et al., 1997). Debido a todo esto, luego del destete hay un aumento en la sincronización de las actividades y encuentros sociales entre los corderos (Veissier et al., 1998). Los corderos presentan una mayor motivación por estar más cerca de sus compañeros sociales y comienzan a investigar su entorno en compañía de sus compañeros (Veissier et al., 1998). En el caso de los corderos mellizos, los hermanos continúan presentando vínculos preferenciales luego del destete, aunque los reportes al respecto son escasos (Walser et al., 1986, Casuriaga et al 2022).

3 HIPOTESIS

La separación definitiva de la madre afecta la intensidad del vínculo entre corderos mellizos.

4 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la intensidad del vínculo entre corderos mellizos se modifica luego de la separación definitiva de la madre durante el destete artificial.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si la separación definitiva de la madre luego del destete artificial modifica la relación entre la distancia que mantienen los corderos mellizos entre sí y la distancia que mantienen en relación a otros corderos del grupo.
- Determinar los cambios comportamentales al destete.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Local de estudio, animales y manejo

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (protocolo número 2020.17). El experimento se realizó en la Estación Experimental Las Brujas del INIA (Canelones, Uruguay, 34º S). Se utilizaron 20 ovejas multíparas y sus respectivos corderos mellizos [11 ovejas Milchschaf (56,6 ± 2,8 kg) y sus corderos (3 pares de hembras, 2 pares de machos y 6 pares de ambos sexos) y 9 ovejas Finish Landrace y sus corderos (3 pares de hembras, 3 pares de machos y 3 pares ambos sexos)]. Las ovejas parieron en invierno (agosto) y el experimento se realizó en primavera (noviembre). Se seleccionó un grupo de corderos homogéneos en edad, peso y distribución de sexos. Inmediatamente luego del parto, las ovejas y sus corderos mellizos se colocaron en parideras donde permanecieron por 48 h. Se colocaron anillos de goma en la base de los testículos de los corderos machos a las 24 h de nacidos como método de castración.

Durante el experimento, los animales se mantuvieron pastoreando *dactylis, lotus* y trébol blanco con libre acceso a agua. Desde las 48 h hasta los 21 días posparto (parto= Dia 0), las ovejas y sus corderos permanecieron pastoreando a cielo abierto durante el día (07:00 a 18:30 h), y en un galpón durante la noche, donde se le suministraba aproximadamente 300 g de maíz quebrado/oveja/día en forma colectiva. Desde el Dia 22 hasta el final del experimento los animales pastorearon a cielo abierto durante todo el día. Al Día 98, se realizó la separación definitiva de los corderos y sus madres. Para eso, se trasladó a las ovejas a un potrero diferente donde no tuvieron contacto visual, auditivo ni olfatorio, quedando los corderos en el mismo potrero.

5.2 Distancia entre corderos mellizos: fotos aéreas y mediciones de distancia

Se tomaron fotografías aéreas del grupo con un drone (DJI Mavic Air 2, Guangdong, China), desde 3 días antes (desde Dia 94 al Dia 96) hasta 1 día después del destete artificial [Día 98 (destete) y Día 99]. Las fotografías aéreas se tomaron con la cámara del drone (sensor: 1/2” CMOS; lente: campo de visión: 84°, distancia focal equivalente: 24 mm, apertura: f/2,8, rango de enfoque: 1 m a ∞; resolución 48 MP 8000 × 6000 píxeles 10 MB; ISO: 100-1600) a una altitud de 39 m (la resolución de las imágenes era 4000 x 3000 píxeles) a una altura de 39 m. Antes de los registros, se capacitó al operador en el uso del dron y se realizó el acostumbramiento de los animales a la presencia del mismo. El acostumbramiento de los animales al drone se realizó sobrevolando el mismo a una altura de 15 m por encima de los animales. Los vuelos se realizaron cada 20 min por 3 días, desde las 14:00 h a las 16:00 h, hasta que los animales no mostraron reacciones al drone.

5.2.1 Área de observación

A los efectos de poder medir la distancia entre los individuos del grupo se delimitó un área de observación donde los animales fueron mantenidos durante las observaciones. La misma fue delimitada con malla eléctrica y sus medidas fueron 67 m x 47 m x 73 m x 49 m. En esa área se distribuyeron 12 escalas de plastillera de 5 m y se pintaron cruces en el suelo para luego poder superponer las fotos durante los análisis de imágenes. Las ovejas con sus corderos se trasladaban 30 minutos antes de iniciar el registro y permanecían allí hasta finalizar las observaciones.

Los animales se identificaron mediante números a nivel de la parrilla costal y mediante una combinación de símbolos y colores a nivel del lomo.

Los registros se realizaron durante 3 días antes del destete (Días 94 al 96), el Día 98 (destete) y el Día 99 post destete. Se tomaron fotografías cada 20 min durante 2 h por la mañana (07:00 a 09:00) y 2 h por la tarde (17:00 a 19:00), totalizando 14 fotografías /día.

5.2.2 Análisis de imágenes

En cada registro se tomaron dos fotos, las cuales se superpusieron en un 10% cubriendo así la totalidad del área de observación. La superposición de las fotos se realizó con Photoshop basándose en la referencia de cruces pintadas en el suelo (figura 1A). Luego de tener las dos fotos alineadas, se procedió a la medición de las distancias. Primeramente, seteamos la escala de medición. Para eso, utilizamos la herramienta regla, a partir de la cual medimos los pixeles de las 12 escalas de 5 m colocadas en toda el área de medición. Con los datos obtenidos calculamos el promedio de los pixeles de las escalas de 5 m, el cual fue utilizado para setear la escala en m. Para eso, nos dirigimos a la opción seteo de escala de medida que nos brinda el programa, completamos con el promedio de pixeles, la longitud lógica en la cual queremos medir que en este caso eran 5 metros y cuanto corresponde la unidad lógica que era metros, quedando lista la conversión. Chequeamos midiendo nuevamente las escalas en el programa y comprobábamos que nos dieran 5 m.

Luego de setear la escala, procedimos a medir la distancia entre animales. Para eso, consideramos la distancia mínima entre corderos, independientemente de la parte del cuerpo a partir de la cual se haga la medición (figura 1B). Para una mayor facilidad al momento de hacer las mediciones, re-identificamos a los animales en las fotografías asignándoles número del 1 al 40 mediante la herramienta del programa que permite agregar “capas” (Figura 1B).

Se calculó el coeficiente de variación a partir de las mediciones de las escalas de 5 m, usando el 10 % de las fotos (totalizando 18 fotos y 216 mediciones), el que fue del 1,5 %.

A)

B)

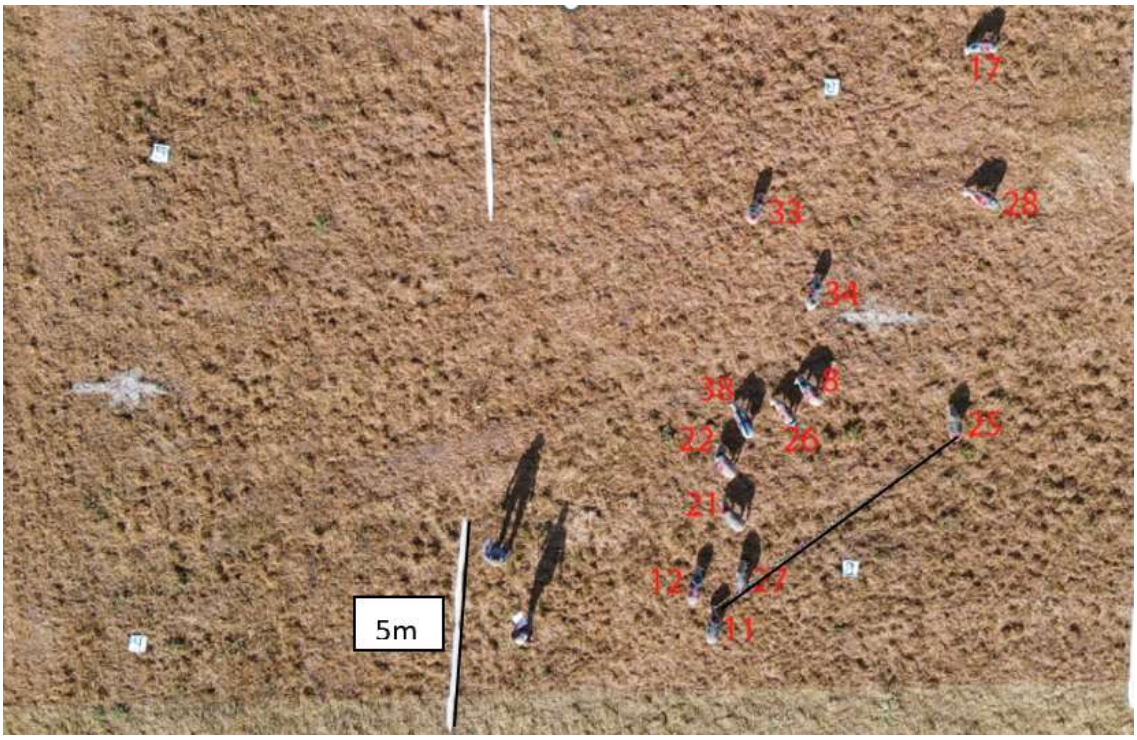

Figura 1. Foto aérea superpuesta de la totalidad del potrero de observación (parte A), foto aérea con zoom que refleja la muestra de la realización de las mediciones (parte B).

5.3 Comportamientos

Se registraron los comportamientos de los corderos (parado, echado, caminando, pastando, rumiando, vocalizando) en los mismos momentos en que se tomaron las fotografías (ver sección 5.2). Los comportamientos se registraron utilizando scans cada 10 min, totalizando 26 scans/día. Inmediatamente antes y después del destete abrupto, se registraron las vocalizaciones individuales de los corderos durante 30 s cada 10 min, utilizando un muestreo 0/1.

5.4 Análisis estadístico

Se testeó la normalidad de los residuos con el test de Shapiro-Wilk. Los datos se analizaron mediante un procedimiento mixto (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EUA). La distancia fue estratificada en dos condiciones: 1) la distancia entre cada cordero y su hermano y, 2) la distancia promedio entre cada mellizo y los demás corderos del grupo, no considerando a su hermano. El modelo incluyó el estrato (2 niveles: nivel 1, la distancia entre cada cordero y su hermano y nivel 2, el promedio de la distancia entre cada cordero a los demás corderos del grupo, no considerando a su hermano), el tiempo (días) y la interacción entre el estrato y el tiempo. El sexo y la raza fueron incluidos como efectos aleatorios en el modelo.

Se calculó la frecuencia de cada comportamiento, la que fue expresada como el porcentaje de observaciones/día. En el modelo se incluyó el tiempo como efecto fijo, y la raza y el sexo como efectos aleatorios. El valor promedio de los Días 94, 95 y 96 fue considerado como un único valor predestete. Luego del destete uno de los corderos murió por causas no relacionadas al estudio, por lo que él y su hermano fueron excluidos del análisis. Los datos se presentaron como MMC ± EEM. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$, y como tendencias cuando $0,05 < p \leq 0,1$.

6 RESULTADOS

6.1 Distancia entre hermanos vs otros corderos del grupo en el tiempo

La distancia entre hermanos fue menor que el promedio de la distancia hacia los otros corderos del grupo (hermanos: 9,2 m ± 0,8 m vs promedio de la distancia a los otros corderos del grupo: 16,4 m ± 0,8 m, P <0,0001). Estas distancias variaron en el tiempo (P <0,0001). Hubo una interacción entre el estrato (nivel 1, la distancia entre cada cordero y su hermano y nivel 2, el promedio de la distancia desde cada cordero a los demás corderos del grupo, no considerando a su hermano), y el tiempo (P <0,0001). La distancia entre hermanos y la distancia promedio entre cada mellizo y los otros corderos del grupo disminuyó desde los Días 94-96 al Día 98 (P <0,0001). Ambas distancias aumentaron desde el Dia 98 al Día 99 (P <0,0001). Sin embargo, la significancia estadística de este aumento fue mayor en el promedio de la distancia hacia los otros corderos del grupo que en la distancia entre hermanos (promedio de la distancia de cada mellizo a los otros corderos del grupo: P <0,0001 vs distancia entre hermanos: P =0,003). En todos los tiempos la distancia entre hermanos fue menor que el promedio de la distancia de cada mellizo a los otros corderos del grupo (P <0,0001) (Figura 2A).

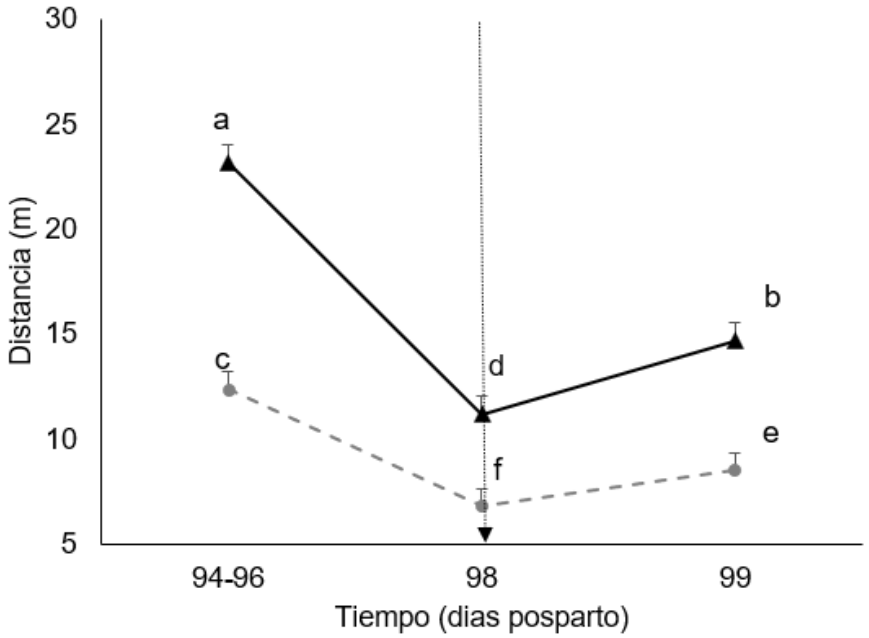

Figura 2. Distancia (MMC ± EEM) entre los hermanos (- ●-) y la distancia promedio entre cada mellizo y los otros corderos del grupo (—▲—) en el tiempo (desde los 94-96 a los 99 días posparto). El día del destete está indicado con una flecha. Diferentes letras indican diferencias en el tiempo y entre estratos (P<0,0001).

6.2 Respuesta comportamental

Hubo efecto del tiempo para el porcentaje de observaciones en las que los corderos estaban parado, echado, pastando, rumiando, caminando y vocalizando ($P < 0,0001$ en todos). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estaban parados disminuyó desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), aumentando desde el Día 98 al Día 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3A). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estuvieron echados aumentó desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), disminuyendo desde el Dia 98 al 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3B). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estuvieron caminando aumentó desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), disminuyendo desde el Día 98 al Día 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3C). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estuvieron pastando disminuyó desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), aumentando desde el Día 98 al Día 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3D). El porcentaje de observaciones en las que los corderos estuvieron rumiando aumento desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), disminuyendo desde el Día 98 al 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3E). El porcentaje de observaciones en las que los corderos vocalizaron aumentó desde el Día 94-96 al Día 98 ($P < 0,0001$), disminuyendo desde el Dia 98 al 99 ($P < 0,0001$) (Figura 3F).

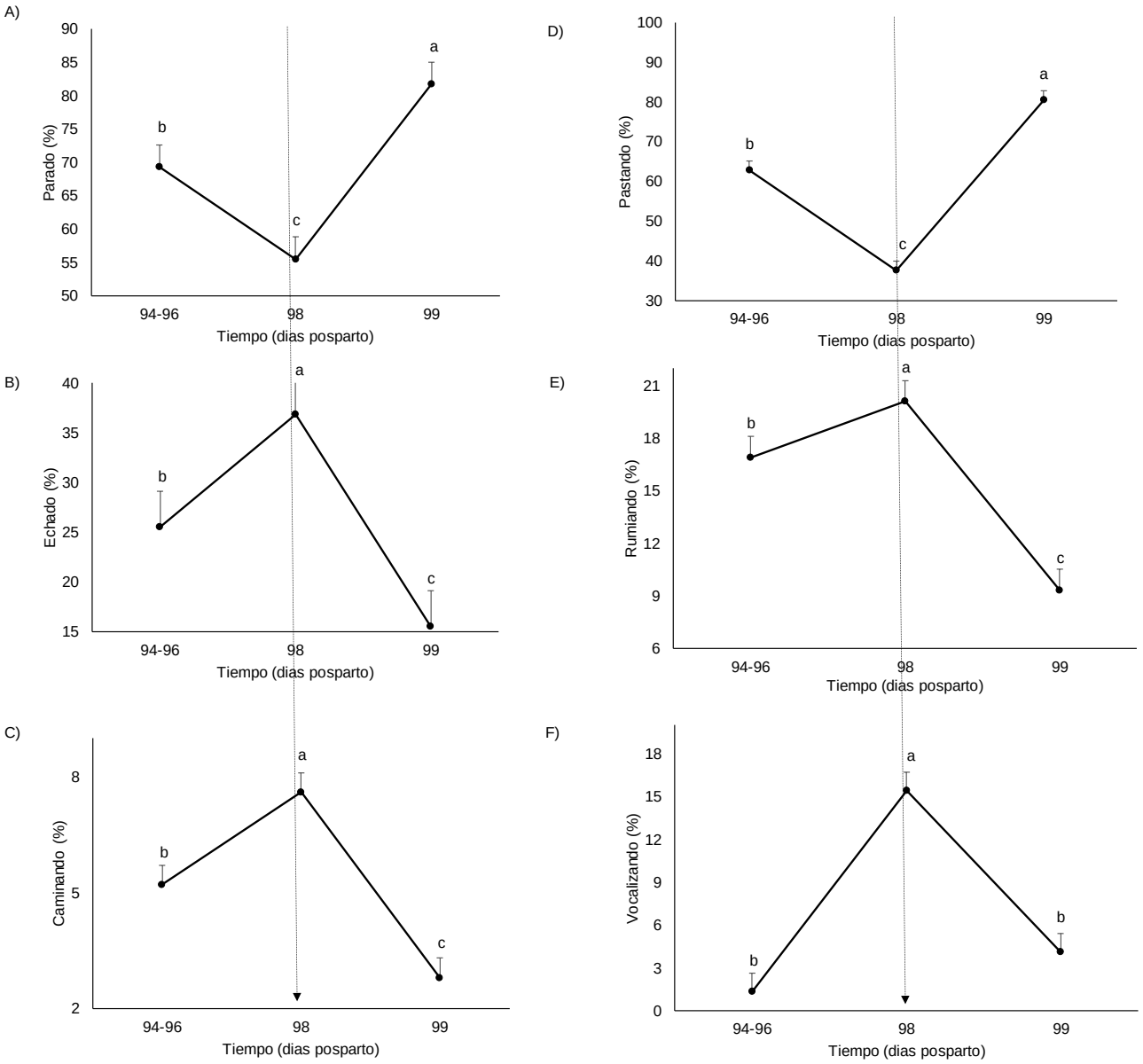

Figura 3. Porcentaje (LSmean ± SEM) de observaciones en las que los corderos estuvieron (A) parados, (B) echados, (C) caminando, (D) pastando, (E) rumiando y (F) vocalizando en el tiempo (desde el Día 94-96 al Día 99 posparto). El día del destete (Día 98) está indicado con una flecha. Diferentes letras indican diferencias en el tiempo (P <0,0001).

7 DISCUSIÓN

Antes y después del destete, la distancia entre los hermanos fue menor que el promedio de las distancias hacia los otros corderos del grupo. Debido a que la cercanía entre individuos se relaciona con la intensidad del vínculo social (Abecia et al., 2022; Ozella et al., 2022), estos resultados sugieren que los corderos mellizos tenían un vínculo preferencial entre sí, el que se mantuvo aun cuando la madre no estaba presente. Luego de la separación de la madre la distancia entre los hermanos disminuyó, indicando que el destete modificó la relación entre los corderos mellizos. Esta disminución de distancia puede aparecer por la reacción de miedo que experimentan los corderos al separarse de su madre, la que podría disminuir mantenerse cerca del hermano ya que la presencia del mismo podría actuar como efecto calmante (Rault et al., 2012). Sin embargo, Casuriaga et al., 2022 demostró que corderos mellizos que se mantienen juntos luego del destete se estresan más que aquellos que son separados, indicando que la presencia del hermano al destete podría contribuir a aumentar la respuesta de estrés de su mellizo y no a disminuirla como ha sido reportado para el caso de otros estresores. Una explicación alternativa seria que los corderos mellizos se acerquen entre sí al querer mamar y percibir la ausencia de la madre. Durante la lactación, la madre amamanta simultáneamente a los hermanos (Ewbank, 1964). Por lo tanto, es posible que los mismos tengan una asociación aprendida que los vincula en momentos como el amamantamiento (Ligout, et al., 2004). Además, la menor distancia entre hermanos al destete coincidió con un aumento del número de vocalizaciones y del porcentaje en que los corderos estuvieron caminando, comportamientos asociados a la búsqueda de la madre (Freitas-de-Melo et al., 2019). Los corderos mellizos destetados y alojados juntos luego del destete vocalizan más que aquellos que son alojados separados de sus hermanos (Casuriaga et al., 2022), indicando que la presencia del hermano amplifica la búsqueda de la madre. En resumen, la separación de la madre al destete aumenta la intensidad del vínculo entre los hermanos reafirmando el rol que cumple la madre en la vida de sus crías.

Se observó que el día del destete no solo disminuyó la distancia entre hermanos, sino también la distancia respecto a los otros corderos del grupo. Esto indicaría que el destete aumenta la cohesión del grupo, posiblemente debido a que la separación de la madre sea percibida por los corderos como reacción estresante de la cual hay que protegerse (Dwyer, 2004). Un día luego del destete ya se observaron cambios en las relaciones de las distancias entre hermanos y los otros corderos del grupo, con respecto al día del destete. Esto podría estar indicando que los animales comienzan a adaptarse a la ausencia de la madre modificando sus relaciones sociales. En este sentido, se ha reportado que el destete impone la necesidad abrupta de reorganización social, aumentando la sincronización de actividades y los encuentros sociales entre los compañeros de grupo (Veissier et al., 1998). Los mellizos presentan un mayor comportamiento de exploración cuando están en grupo que cuando están solos (Millman y Duncan, 2001). Además, el modo de actuar de los compañeros puede hacer que un animal copie el mismo comportamiento en ese ambiente debido a una facilitación social o contagio. Si bien los cambios en las distancias entre individuos comienzan prontamente luego del destete, esto no necesariamente estaría indicando que los corderos se hayan adaptado al cambio ya que es posible que el estrés generado por estos cambios se mantenga por más tiempo, debido por ejemplo al establecimiento de nuevas jerarquías sociales (Veissier et al., 1998). Para eso, sería importante estudiar el vínculo entre hermanos y con los

demás individuos del grupo por más tiempo luego del destete, lo que también nos daría idea de la importancia de la madre en el mantenimiento del vínculo.

Las alteraciones de las actividades locomotoras y comportamentales observados al destete en el presente estudio (menor frecuencia de pastoreo, mayor frecuencia del tiempo caminando y aumento del número de vocalizaciones) coinciden con lo reportado previamente (Freitas-de-Melo et al., 2019), reafirmando que el destete es un manejo estresante. Posiblemente debido al costo energético que representa mantener estos comportamientos es que los mismos comienzan a mermar rápidamente luego del destete.

8 CONCLUSIÓN

Los corderos mellizos presentan un vínculo preferencial entre sí, cuya intensidad aumenta cuando son separados definitivamente de su madre, quedando en evidencia que la madre influye en la manifestación de este vínculo.

BIBLIOGRAFIA

Abecia, J. A., Canudo, C., Palacios, C., & Canto, F. (2022). Measuring lamb activity during lactation by actigraphy. *Chronobiology International*, *39*(10), 1368-1380.

Arnold, G. W., & Pahl, P. J. (1974). Some aspects of social behaviour in domestic sheep. *Animal Behaviour*, *22*(3), 592-600.

Alexander, G. (1985). Odour, and the recognition of lambs by Merino ewes. En *Reproductive and Developmental Behaviour in Sheep* (pp. 303-308). Amsterdam: Elsevier.

Boccia, M.L., Scanlan, J.M., Laudenslager, M.L., Berger, C.L., Hijazi, A.S., y Reite, M.L. (1997). Juvenile friends, behavior, and immune responses to separation in bonnet macaque infants. *Physiology and Behavior,* 61, 191-198.

Boissy, A., & Le Neindre, P. (1990). Social influences on the reactivity of heifers: implications for learning abilities in operant conditioning. *Applied Animal Behaviour Science,* 25, 149-165.

Bowlby, J. (1979). *The making and breaking of affectional bonds*. London: Tavistock Publications.

Bouissou, M. F., & Andrieu, S. (1977). Etablissement des relations de dominance-soumission chez les bovins domestiques. IV. Etablissement des relations chez les jeunes. *Behavioral Biology*, 2, 97-107.

Bouissou, M. F., & Andrieu, S. (1978). Etablissement des relations préférentielles chez les bovins domestiques. *Behaviour*, 64(1-2), 148-157.

Casuriaga, D., Ungerfeld, R., Ciappesoni, G., & Freitas-de-Melo, A. (2022). Lambs are more stressed at early weaning when housed with their twin. *Tropical Animal Health and Production*, 54(2), 123.

Cirulli, F., Terranova, M.L., & Laviola, G. (1996). Affiliation in periadolescent rats: behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar and unfamiliar partners. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior,* 54, 99-105.

Damián, J. P., Hötzel, M. J., Banchero, 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(3), 913-918.

Doyle, R. E., Broster, J. C., Barnes, K., & Browne, W. J. (2016). Temperament, age and weather predict social interaction in the sheep flock. *Behavioural Processes*, 131, 53-58.

Dwyer, C. M. (2004). How has the risk of predation shaped the behavioural responses of sheep to fear and distress?. *Animal Welfare*, 13(3), 269-281.

Dwyer, C. M., Nowak, R., Porter, R. H., Blache, D., & Dwyer, C. M. (2008). Behaviour and the welfare of the sheep. En *The welfare of sheep* (pp. 81-134). Dordrecht: Springer.

Dwyer, C. M., Dwyer, C. M., & Lawrence, A. B. (2008). *Introduction to animal welfare and the sheep* (pp. 1-40). En *The welfare of sheep* (pp. 81-134). Dordrecht: Springer.

Estevez, I., Andersen, I. L., & Nævdal, E. (2007). Group size, density and social dynamics in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 103(3-4), 185-204.

Ewbank, R. (1964). Observations on the suckling habits of twin lambs. *Animal Behaviour*, 12(1), 34-37.

Fisher, A., & Matthews, L. (2001). The social behaviour of sheep. En *Social behaviour in farm animals* (pp. 211-245). Wallingford UK: CABI publishing.

Freitas-de-Melo, A., Banchero, G., Hötzel, M. J., Damián, J. P., & Ungerfeld, R. (2013). Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal*, *7*(8), 1367-1373.

Freitas-de-Melo, A., Orihuela, A., Hötzel, M. J., & Ungerfeld, R. (2022). What do we know and need to know about weaning in sheep? An overview of weaning practises, stress and welfare. *Frontiers in Animal Science*, 3, 4.

Freitas-de-Melo, A., Terrazas, A., Ungerfeld, R., Hötzel, M. J., Orihuela, A., & Pérez-Clariget, R. (2018). Influence of low pasture allowance during pregnancy on the attachment between ewes and their lambs at birth and during lactation. *Applied Animal Behaviour Science*, 199, 9-16.

Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., & Orihuela, A. (2021). Behavioral and physiological responses to early weaning in ewes and their single or twin lambs. *Tropical Animal Health and Production*, 53, 1-12.

Freitas-de-Melo, A., Ungerfeld, R., & Pérez-Clariget, R. (2019). Behavioral pattern in Texel × Corriedale terminal crossbreeding: Maternal behavior score at birth, lambs' feeding behaviors, and behavioral responses of lambs to abrupt weaning. *Journal of Veterinary Behavior*, 30, 9-15.

Freitas-de-Melo, A., & Ungerfeld, R. (2016). Destete artificial en ovinos: respuesta de estrés y bienestar animal. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *7*(3), 361-375.

Galeana, L., Orihuela, A., Aguirre, V., & Vázquez, R. (2007). Mother-young spatial association and its relation with proximity to a fence separating ewes and lambs during enforced weaning in hair sheep (Ovis aries). *Applied Animal Behaviour Science*, 108(1-2), 81-88.

Goursaud, A. P., & Nowak, R. (1999). Colostrum mediates the development of mother preference by newborn lambs. *Physiology & behavior*, 67(1), 49-56.

Grubb, P. E. T. E. R. (1974). Mating activity and the social significance of rams in a feral sheep community. *The behaviour of ungulates and its relation to management*, 1(24), 457-476.

Guesgen, M. J., Beausoleil, N. J., Minot, E. O., Stewart, M., & Stafford, K. J. (2014). Social context and other factors influence the behavioural expression of pain by lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 159, 41-49.

Insel, T.R. (1997). A neurobiological basis of social attachment. *American Journal of Psychiatry*, 154, 726-735.

Kalin, N. H., Shelton, S. E., & Lynn, D. E. (1995). Opiate systems in mother and infant primates coordinate intimate contact during reunion. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(7), 735-742.

Keller, M., Meurisse, M., Poindron, P., Nowak, R., Ferreira, G., Shayit, M., & Lévy, F. (2003). Maternal experience influences the establishment of visual/auditory, but not olfactory recognition of the newborn lamb by ewes at parturition. *Developmental Psychobiology*, 43(3), 167-176.

Kendrick, K. M. (2008). Sheep senses, social cognition and capacity for consciousness. *The welfare of sheep* (pp. 135-157). Dordrecht: Springer.

Keeling, L. J., & Gonyou, H. W. (Eds.). (2001). *Social behaviour in farm animals*. Wallingford: CABI publishing.

Keverne, E. B., & Kendrick, K. M. (1992). Oxytocin facilitation of maternal behavior in sheep. En C. A. Pedersen, J. D. Caldwell, G. F. Jirikowski, & T. R. Insel (Eds.), *Oxytocin in maternal, sexual, and social behaviors* (pp. 83–101). New York: Academy of Sciences.

Koolhaas, J. M., Meerlo, P., De Boer, S. F., Strubbe, J. H., & Bohus, B. (1997). The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 775-782.

Larrondo, C., Orihuela, A., Strappini, A., Acosta-Jamett, G., Mota-Rojas, D., & Gallo, C. (2020). Provision of straw and the presence of undocked lambs reduce the behavioural and physiological expressions of pain and stress associated with tail docking in lambs: a preliminary study. *Animal Production Science*, 61(4), 423-431.

Lawrence, A. B. (1990). Mother-daughter and peer relationships of Scottish hill sheep. *Animal Behaviour*, 39(3), 481-486.

Lévy, F., Keller, M., & Poindron, P. (2004). Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior*, 46(3), 284-302.

Ligout, S. K. (2004). *The role of olfactory cues in the discrimination of agemates by lambs. Animal Behaviour,* 68(4), 785-792.

Ligout, S., Sebe, F., & Porter, R. (2004). Vocal discrimination of kin and non-kin agemates among lambs. *Behaviour*, 141(3), 355-369.

Ligout, S., & Porter, R. H. (2003). Social discrimination in lambs: the role of indirect familiarization and methods of assessment. *Animal Behaviour*, 65(6), 1109-1115.

Ligout, S., & Porter, R. H. (2004). Effect of maternal presence on the development of social relationships among lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(1-2), 47-59.

Lynch, J. J., Keogh, R. G., Elwin, R. L., Green, G. C., & Mottershead, B. E. (1983). Effects of early experience on the post-weaning acceptance of whole grain wheat by fine-wool Merino lambs. *Animal Science*, 36(2), 175-183.

Menant, O., Ungerfeld, R., Pérez-Clariget, R., & Freitas-de-Melo, A. (2020). Is body surface temperature measured on the single lambs' back a reliable indicator of the ewe-lamb bond around birth?. *Journal of Thermal Biology*, 93, 102699.

Michelena, P., Sibbald, A. M., Erhard, H. W., & McLeod, J. E. (2009). Effects of group size and personality on social foraging: the distribution of sheep across patches. *Behavioral Ecology*, 20(1), 145-152.

Millman, S. T., & Duncan, I. J. H. (2001). Social cognition of farm animals. En *Social behaviour in farm animals* (pp. 373-399). Wallingford UK: CABI Publishing.

Napolitano, F., De Rosa, G., & Sevi, A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 110(1-2), 58-72.

Nicol, C. J. (1995). The social transmission of information and behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 44(2-4), 79-98.

Newberry, R., & Swanson, J. (2001). Breaking social bonds. En *Social behaviour in farm animals* (pp. 307-331). Wallingford: CABI Publishing.

Norton, E., Benaben, S., Mbotha, D., & Schley, D. (2012). Seasonal variations in physical contact amongst domestic sheep and the implications for disease transmission. *Livestock Science*, 145(1-3), 34-43.

Nowak, R. (1990). Mother and sibling discrimination at a distance by three-to seven-day-old lambs. *Developmental Psychobiology*, 23(3), 285-295.

Nowak, R. (2006). Suckling, milk, and the development of preferences toward maternal cues by neonates: from early learning to filial attachment?. *Advances in the Study of Behavior*, 36, 1-58.

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(11), 1042-1053.

Nowak, R., Poindron, P., & Putu, I. G. (1989). Development of mother discrimination by single and multiple newborn lambs. *Developmental Psychobiology*, 22(8), 833-845.

Nowak, R. F., & Lindsay, D. R. (1992). Discrimination of merino ewes by their newborn lambs: important for survival? *Applied Animal Behaviour Science*, 34, 61-74.

Ozella, L., Langford, J., Gauvin, L., Price, E., Cattuto, C., & Croft, D. P. (2020). The effect of age, environment and management on social contact patterns in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 225, 104964.

Ozella, L., Price, E., Langford, J., Lewis, K. E., Cattuto, C., & Croft, D. P. (2022). Association networks and social temporal dynamics in ewes and lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 246, 105515.

Panksepp, J. (1998) *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*. New York: Oxford University Press.

Porter, R. H., Nowak, R., & Orgeur, P. (1995). Influence of a conspecific agemate on distress bleating by lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 45(3-4), 239-244.

Rault, J. L. (2012). Friends with benefits: social support and its relevance for farm animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 136(1), 1-14.

Shackleton, D. M., & Haywood, J. (1985). Early mother–young interactions in California bighorn sheep, Ovis canadensis californiana. *Canadian Journal of Zoology*, 63(4), 868-875.

Ungerfeld, R., Freitas-de-Melo, A., Nowak, R., & Lévy, F. (2018). Preference for the mother does not last long after weaning at 3 months of age in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 205, 28-33.

Veissier, I., Boissy, A., Nowak, R., Orgeur, P., & Poindron, P. (1998). Ontogeny of social awareness in domestic herbivores. *Applied Animal Behaviour Science*, 57(3-4), 233-245.

Walser, E. S., Hague, P., & Yeomans, M. (1985). Variations in the strength of maternal behaviour and its conflict with flocking behaviour in Dalesbred, Jacob and Soay ewes. En *Reproductive and Developmental Behaviour in Sheep* (pp. 153-158). Amsterdam: Elsevier.

Walser, E. S., Willadsen, S., & Hague, P. (1981). Pair association between lambs of different breeds born to Jacob and Dalesbred ewes after embryo transplantation. *Applied Animal Ethology*, *7*(4), 351-358.

Walser, E. S., Hague, P., & Walters, E. (1981). Vocal recognition of recorded lambs voices by ewes of three breeds of sheep. *Behaviour*, 78(3-4), 260-271.

Walser, E. S., & Williams, T. (1986). Pair-association in twin lambs before and after weaning. *Applied Animal Behaviour Science*, 15(3), 241-245.

Weary, D. M., Jasper, J., & Hötzel, M. J. (2008). Understanding weaning distress. *Applied Animal Behaviour Science*, 110(1-2), 24-41.

Wey, T., Blumstein, D. T., Shen, W., & Jordán, F. (2008). Social network analysis of animal behaviour: a promising tool for the study of sociality. *Animal Behaviour*, *75*(2), 333-344.

Wyse, C. A., Zhang, X., McLaughlin, M., Biello, S. M., Hough, D., Bellingham, M., ... & Evans, N. P. (2018). Circadian rhythms of melatonin and behaviour in juvenile sheep in field conditions: Effects of photoperiod, environment and weaning. *Physiology & Behavior*, 194, 362-370.