

Informe final publicable de proyecto

Activación neuronal, comportamiento y estrés en corderos: efectos de la presencia de la madre y sus señales olfatorias

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_163004

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2023

FREITAS DE MELO, Aline (Responsable Técnico - Científico)

LAGOS SMEJA, Patricia Friné (Investigador)

LÉVY, Frederic (Investigador)

MENANT, Ophélie (Investigador)

PÉREZ CLARIGET, Raquel (Investigador)

UNGERFELD MORÓN, Rodolfo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \ \

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA

Resumen del proyecto

El vínculo madre-cría en ovinos es selectivo y se establece después del parto, manteniéndose durante el periodo de lactación a partir de señales olfatorias, visuales y auditivas. La neurobiología materna está bien establecida en la literatura, pero no existe información sobre las vías neuronales del cordero relacionadas con el vínculo con su madre. La separación de su madre, ya sea temporal o definitiva, con o sin aislamiento de otros animales del grupo, genera importantes respuestas de estrés en el cordero. El objetivo de este proyecto fue cuantificar las neuronas activadas que conforman la red neuronal del sistema nervioso central del cordero relacionadas con el reconocimiento de su madre a partir del procesamiento olfatorio, auditivo y visual. En forma complementaria nos planteamos determinar los efectos de las señales olfatorias maternas sobre el comportamiento y la respuesta de estrés durante la etapa de lactación. Una mayor cantidad de neuronas del sistema olfatorio de corderos se activaron cuando estos son expuestos a su madre que a otra oveja lactante o cuando no reciben estímulo social. También se determinó que los corderos de 60 y 90 días de edad reconocen las señales olfatorias maternas y presentan un mayor número de vocalizaciones cuando separados de su madre y expuestos al olor de la lana materna. Estos resultados habilitan a profundizar los trabajos en que se utiliza lana de la madre como posible señal moduladora del comportamiento de los corderos, desarrollando estrategias para su aplicación práctica.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Neurobiología y comportamiento

Palabras clave: vínculo madre-cría / vías neurales / destete /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El ovino es una especie social y precocial, que normalmente tiene 1-2 crías que son capaces de ver, oír, ponerse en pie y seguir a la madre momentos después de nacidos. Las ovejas presentan una estacionalidad reproductiva, concentrando los partos en primavera, lo que implica una gran cantidad de madres y corderos lactantes en el mismo grupo social. Para amamantar solamente sus propias crías, las ovejas establecen un vínculo fuerte y selectivo con su cordero luego del parto (Poindron y LeNeindre, 1980). El comportamiento materno es estimulado por los cambios neuroendocrinos al parto que incluyen la disminución en la concentración de progesterona, y el aumento en las concentraciones de estrógenos, prolactina y oxitocina (Lévy y Keller, 2008). Luego del parto, la oveja tiene una fuerte atracción hacia el líquido amniótico que recubre al cordero, lo acicala y emite balidos de tono bajo (Levy y Keller, 2008; Poindron y LeNeindre, 1980). Estos comportamientos son esenciales para que la madre identifique individualmente a su cría, lo que ocurre luego de 30 a 120 min de contacto con la misma (Poindron y LeNeindre, 1980; Smith et al., 1966). Una vez concluido este periodo, la madre rechaza agresivamente a las crías ajenas o a aquellas que no fueron identificadas como propias (Poindron et al., 2007). Los cambios de progesterona y estrógenos al parto estimulan la expresión de los receptores de oxitocina en diferentes zonas del cerebro relacionadas con el despliegue del comportamiento materno (por ej. área preóptica medial del hipotálamo, hipotálamo ventromedial, amígdala, núcleos del lecho de la estría terminal y núcleos paraventricular del hipotálamo; Broad et al., 1999). Además, los cambios neuroendocrinos que ocurren al parto y la presencia del cordero recubierto con líquido amniótico aumentan la expresión de c-fos y zif/268 (indicadores de activación neuronal) en las zonas olfativas primarias (bulbo olfatorio), secundarias (corteza piriforme, amígdala y núcleos medianos del tálamo) y terciarias (corteza orbitofrontal, corteza entorrinal, y giro dentado) del cerebro de la oveja (Da Costa et al., 1997). Los corderos se paran entre 20 y 60 min después de nacidos e ingieren calostro a los 20 a 95 min (Slee y Springbett, 1986). El cordero se dirige inicialmente hacia la ubre de su madre basado en los comportamientos de aceptación (la oveja emite vocalizaciones de frecuencia baja y permite el amamantamiento) o de rechazo (despliegue de comportamientos agresivos y vocalizaciones de alta frecuencia) (Terrazas et al., 2002). Durante las primeras dos semanas de vida las ovejas permiten al cordero mamar cada vez que lo requiere, pero a medida que la lactación avanza, lo rechaza con mayor frecuencia (Fletcher, 1971), pasando de 1-2 amamantamientos/h en la primer semana a 1-2 cada 6 h antes del destete (Ewbank, 1964, 1967; Fletcher, 1971).

Un aspecto central para el amamantamiento durante el periodo de lactación es la capacidad del cordero y su madre para identificarse mutuamente. El reconocimiento entre la oveja y el cordero ocurre a través de señales olfativas, auditivas y visuales (Keller et al., 2003; Nowak, 1990; Nowak, 1991; Sèbe et al., 2007). El reconocimiento a distancia permite a la madre localizar a su cría, mientras que el reconocimiento a corta distancia posibilita el amamantamiento (Lindsay y Fletcher, 1968). Las ovejas utilizan primariamente las vías olfatorias para reconocer a su cría, pero también pueden identificar sus corderos a distancias mayores a 1 m, utilizando solamente las vías auditivas y visuales (Ferreira et al., 2000; Keller et al., 2003). El reconocimiento a distancia de los corderos hacia sus madres, también se da a través de señales auditivas y visuales, teniendo el olfato mayor importancia para la identificación de la ubre de su madre a cortas distancias (Nowak, 1991; Searby y Jouventin, 2003; Nowak et al., 2007). Los corderos reconocen a sus madres a partir de las 12 a 24 h de edad,

habilidad que mejora marcadamente en los primeros días de vida (Nowak et al., 1989). El desarrollo de la identificación inicial del cordero hacia su madre es dependiente de los eventos de amamantamiento. Cuando los corderos son impedidos de mamar las primeras horas posparto, ya no son capaces de identificar a su madre (Nowak et al., 1997). Durante el amamantamiento ocurren estímulos orales y gastrointestinales que envían señales sensoriales al sistema nervioso central, influenciando el establecimiento y el mantenimiento del vínculo entre la madre y la cría. En este sentido, tanto la administración de calostro como la de solución salina por sonda nosagástrica, o utilizando una botella con tetetas en cantidades similares a las que son normalmente ingeridas por el cordero al parto, son suficientes para que el mismo reconozca a su madre frente a otra oveja las primeras horas de vida (Val-Laillet et al., 2004b; Nowak et al., 2007; 2006). Cuando el volumen de calostro y de solución salina es reducido hasta la mitad, solamente el calostro mantiene el reconocimiento del cordero hacia su madre. En este contexto, la colecistoquinina (CCK), péptido producido por el intestino delgado y que también es liberado en el hipotálamo, tiene un rol en el vínculo del cordero hacia su madre. Al inyectar un antagonista de la CCK, los corderos dejan de discriminar a su madre frente a otra oveja (Goursaud y Nowak, 2000; Shayt et al., 2003). Por tanto, la ingestión de calostro es esencial para establecimiento y mantenimiento del vínculo oveja-cordero.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en los sistemas de producción ovina de carne y lana presentes en Uruguay, normalmente se realiza un destete artificial y la separación definitiva de la cría y su madre a los 3 meses de edad (Freitas-de-Melo et al., 2016). La separación madre-cría es una situación estresante para la oveja y su(s) cordero(s), ya que implica la ruptura del vínculo emocional, asociada a cambios nutricionales y en el ambiente físico y social (Dwyer, 2017). Luego de la separación oveja-cordero, se observan cambios comportamentales en la diada asociados con la búsqueda de la cría o de la madre, reducción del tiempo dedicado al descanso y a la alimentación (Freitas-de-Melo et al., 2013; 2017; 2019). También se observan cambios fisiológicos indicadores de estrés, como el aumento de cortisol, y cambios en las concentraciones de proteínas séricas (Freitas-de-Melo et al., 2013; 2017; 2020; Pérez-León et al., 2006). Por lo que es necesario estudiar los componentes involucrados en estas respuestas para desarrollar estrategias de manejo para reducirlas.

De acuerdo a nuestro conocimiento, existe un único estudio de neurobiología en corderos relacionado al vínculo con su madre, en el que se describe la activación de algunas zonas en el cerebro de los corderos luego de la ingestión de calostro (Val-Laillet et al., 2009). En este se demostró que la ingesta de calostro activa neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, y de la corteza de la amígdala y de la corteza insular. Mientras que las dos primeras regiones son responsables de la secreción de oxitocina, las dos últimas zonas están relacionadas con los procesos de aprendizaje, asociación de fenómenos y la emoción. Por tanto, considerando que los corderos reconocen a su madre a través de señales olfativas, auditivas y visuales, se espera que el vínculo y la presencia de la madre durante el periodo de lactación activen las principales regiones cerebrales involucradas en el procesamiento de estas señales. Las principales regiones vinculadas con las señales olfatorias son el bulbo olfatorio principal, el bulbo olfatorio accesorio, los núcleos amigdalinos cortical y medial, las regiones orbitofrontal, piriforme y endopiriforme corticales; las vinculadas con las señales auditivas son la corteza auditiva inferior colicular e insular; y las vinculadas a las señales visuales son el núcleo basal de la amígdala, y la corteza temporal (Lévy y Keller, 2008; Lonstein et al., 2015; Nowak et al., 2016).

Se espera cuantificar las neuronas activadas que conforman la red neuronal del sistema nervioso central del cordero relacionadas con el reconocimiento de su madre a partir del procesamiento olfatorio, auditivo y visual. En forma complementaria nos planteamos determinar los efectos de las señales olfatorias maternas sobre el comportamiento y la respuesta de estrés durante la etapa de lactación.

Metodología/Diseño del estudio

Experimento 1: Efecto de la exposición de la madre sobre la activación neuronal de corderos

El trabajo de campo se realizó en la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (Facultad de Agronomía, UdelaR, Cerro Largo), con ovejas Corriedale multíparas de parto simple, pastoreando campo natural. Se utilizaron 30 ovejas y sus corderos machos. A las 3 semanas de edad se testeó la preferencia de los corderos por su madre u otra oveja de la misma majada de acuerdo a Ungerfeld et al. (2018) para asegurar que se mapeen las vías neurales solamente en corderos que efectivamente tuvieran una clara motivación por su madre.

A las 4 semanas de edad se realizaron las pruebas para determinar las vías neurales que se activaron por la presencia de su madre en un corral de 6 m x 4 m, cerrado y techado, aislado del exterior. El corral estaba dividido por una malla en dos partes iguales, con una línea dibujada en el piso a 80 cm de la malla. El corral impedía cualquier tipo de comunicación con animales o personas del exterior. Primeramente, los corderos fueron aislados durante 90 min, y luego se aplicaron 3 tratamientos experimentales durante otros 90 min a 10 corderos cada uno: 1) Aislados: continuaron aislados durante este período; 2) Madre: se introdujo a su madre en el corral adyacente durante este período; y 3) Ajena: se introdujo en dicho

corral a una oveja de la misma majada que no era la madre. Durante todo el periodo se filmaron los comportamientos de los corderos y se registraron: el tiempo caminando dentro de la zona de 80 cm cercana a la malla, el tiempo total adentro de la zona cercana a la malla, la cantidad de vocalizaciones, la cantidad de intentos de contacto con la madre/oveja ajena y el tiempo olfateando a la madre/oveja ajena. En los tratamientos 2) y 3) se evitó el contacto directo entre los corderos y su madre para evitar el amamantamiento ya que le mismo activaría otras zonas cerebrales, impidiendo aislar el efecto de la presencia de la madre. El tiempo de contacto se definió de acuerdo al tiempo necesario para poder detectar la expresión de C-Fos en ovinos (Guesdon et al., 2016). Para disminuir los efectos del estrés del aislamiento social, los corderos tuvieron el mismo manejo, sin su madre, durante 90 min 4 veces en los días anteriores a dicha prueba.

Al final del tratamiento, se administró tiopental intravenoso a los corderos, fueron sacrificados, y se extrajeron los cerebros y los bulbos olfatorios de acuerdo a Guesdon et al. (2016). Las cabezas fueron perfundidas a través de sus arterias carótidas con 1 L de nitrato de sodio 1% a 37 °C, seguido por 2 L de solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato a 4°C (pH 7,4, 0,1 M). El cerebro y los bulbos olfatorios fueron removidos del cráneo y fijados en la misma solución de paraformaldehído durante 24 h. Ambos tejidos quedaron en solución de sacarosa al 20% y azida de sodio al 0,1% hasta la futura realización de los cortes con criostato.

Cortes histológicos, inmunohistoquímica y análisis de imagen

Los bulbos olfatorios fueron congelados y cortados completamente en secciones coronales de 30 μ m utilizando un criostato. Se seleccionaron entre 8-12 secciones a lo largo del bulbo olfatorio por animal. Se almacenaron las secciones seleccionadas en solución de PBS con azida 4°C hasta la realización de la inmunohistoquímica.

Los cerebros fueron congelados y cortados completamente en secciones coronales de 30 μ m utilizando un criostato de la Facultad de Medicina (UdelaR), colectados y mantenidos en una solución crioprotectora a -20°C hasta la realización de la inmunohistoquímica. Para cada animal, se coloreó una de cada 15 secciones con violeta de cresilo para identificar las estructuras del cerebro. La localización neuroanatómica de las diferentes zonas del cerebro se basó en Johnson et al. (2019) (<https://msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>).

Para la inmunohistoquímica de C-Fos se utilizó el procedimiento descrito por Val-Laillet et al. (2004) con ligeras modificaciones. Las secciones se incubaron a 4 °C durante 1 h en Tris-Buffer Salino (TBS) conteniendo 1% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Luego fueron colocados en TBS conteniendo 0,3% Triton X-100, 0,1 % de azida de sodio (TA) y 1 % de albúmina sérica bovina (BSA; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU) a 4° C durante 1 h. Inmediatamente de esto las secciones fueron incubadas durante 48 h a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal de ratones contra C-Fos (ref sc-271243 C10, Santa Cruz Biotechnology, TX, EEUU), diluido 1:2.000 en TBS-TA-BSA. Luego fueron lavadas durante 8 min en TBS e incubados a 4 °C durante 3 h con un anticuerpo suero anti inmunoglobulina G de ratón (biotin-SP sheep; ref 515-065-062; Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, EEUU) diluido 1:500 en TBS-BSA. Las secciones fueron lavadas nuevamente con TBS e incubadas durante la noche a 4 °C con HRP-Streptavidin (ref SA-5004; Vector Laboratories, CA, EEUU) diluido 1:1000 en TBS-BSA. Luego, las secciones fueron lavadas dos veces con TBS y dos con Tris-HCl durante 8 min cada vez. Finalmente, el complejo HRP fue visualizado utilizando una mezcla de 0,04 % de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, MA, EEUU), 0,3% níquel amonio sulfato, y 0,003% H₂O₂ en Tris-HCl (50 mm, pH 7,6) durante 9 a 15 min.

Las secciones fueron armadas en porta objetos gelatinizados, secadas en estufa, y luego deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, clareadas en tolueno y montadas con un cubreobjetos con DEPEX. Dado el tamaño de las estructuras a analizar fue necesario utilizar portas de un tamaño mayor a los estándares, y un microscopio con platina motorizada acoplado a un sistema de adquisición de imágenes para combinar una serie de imágenes pequeñas y reconstruir una imagen mosaico completa de cada corte coronal del cerebro. Las células positivas a C-Fos fueron contadas en cada región con el software Fiji (ImageJ, Version 3.1.1, Schindelin et al. 2012), utilizando cada imagen mosaico. Se tuvo en cuenta la escala de gris y criterios de forma y tamaño al utilizar el software Fiji.

Análisis estadístico

Se determinó la distribución de los residuos de cada comportamiento que realizaron los corderos durante las pruebas previas al sacrificio con el test de Shapiro-Wilk. La frecuencia de cada comportamiento fue comparada con análisis de varianza o con el test de Kruskal-Wallis. La densidad de células positivas para C-Fos en cada región se comparó entre grupos por análisis de varianza.

Experimentos 2 y 3: Señal olfativa y separación madre-cría a diferentes edades

Se utilizarán 60 ovejas múltiparas de partos simples y sus corderos machos (30 corderos con 60 días de edad y 30 con 90). Todos los corderos fueron separados a los 60 o 90 días de edad de sus madres, permaneciendo sin contacto olfativo,

visual o auditivo con las mismas. Previo a la separación a 20 corderos se les colocó una máscara con lana de su madre; a 20 corderos se les colocó una máscara con lana de una oveja conocida; y a otros 20 corderos se les colocó una máscara sin lana. Las máscaras estaban basadas en las utilizadas en ovejas por Ungerfeld et al. (2008). Se habituó a los corderos al uso de las máscaras colocándolas durante 2 h diariamente durante la semana anterior. La lana fue muestreada de ambos flancos, del pecho con una esquiladora manual y mezclada con cera inguinal (Alexandre-Pires et al., 2017). Las muestras fueron sacadas el anterior a la separación maternal y congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en alícuotas individuales de acuerdo a lo descrito previamente (Lenochova et al., 2009).

Separación de la madre y prueba de aislamiento social

Todos los corderos de cada grupo fueron separados de sus madres 60 min antes del aislamiento social. En esta prueba se aisló a los corderos en forma individual, durante 10 minutos, en un área desconocida, cerrada, con paredes blancas para que el animal no tuviera contacto visual y olfativo con otros animales o personas, y con el piso dividido en cuadrantes. Se registraron las actividades de los animales mediante dos cámaras de video. A partir de los videos se registró la frecuencia de olfateos, inmobilizaciones, intentos de escape, líneas divisorias cruzadas, vocalizaciones y eliminaciones (orinar + defecar). Además, se determinó la latencia a la primera vocalización, eliminación, y el tiempo de permanencia en los cuadrantes de la periferia.

Se determinaron la temperatura rectal, y las temperaturas superficiales por termografía de ojo, hocico y orejas con una cámara termográfica (Flir 95, Estonia) y frecuencias cardíaca y respiratoria a los -5, 0, 10, 20, 30 y 45 min de realizada la prueba.

Los datos colectados de manera repetida en el tiempo fueron comparados mediante ANOVA con un modelo mixto, incluyendo el tratamiento, el tiempo y su interacción como efectos fijos. La frecuencia de los comportamientos realizados durante el aislamiento social fue comparada mediante ANOVA o Kruskal-Wallis de acuerdo a la distribución.

Resultados, análisis y discusión

Experimento 1: Efecto de la exposición de la madre sobre la activación neuronal de corderos

Los corderos de los tres grupos difirieron en el tiempo de caminata ($3,1 \pm 17\text{ s}$, $29,4 \pm 10,0\text{ s}$ y $210,5 \pm 37,6\text{ s}$; para corderos ISO, LE y MOT, respectivamente, $P < 0,0001$). Los corderos MOT y LE vocalizaron más que los corderos ISO ($17,3 \pm 4,7$ y $7,4 \pm 4,5$ vs $0,1 \pm 0,1$; $P = 0,01$ y $P = 0,02$, respectivamente). Los corderos MOT intentaron reunirse con su madre más veces que los corderos LE con la oveja lactante ($21,7 \pm 5,8$ vs $2,6 \pm 1,0$; $P = 0,04$), olfatearon más a menudo a la madre ($13,3 \pm 3,3$ vs $4,0 \pm 1,1$; $P = 0,01$), y tendieron a hacerlo durante más tiempo ($27,1 \pm 11,1\text{ s}$ frente a $4,9 \pm 1,4\text{ s}$; $P = 0,059$). La inmunorreactividad de C-Fos de la capa granular difirió según el tratamiento ($P = 0,049$): fue mayor en MOT que en los corderos ISO ($1,59 \pm 0,27 \times 10^{-3}\text{ mm}^3$ vs $1,17 \pm 0,26 \times 10^{-3}\text{ mm}^3$; $P = 0,014$), mientras que los corderos LE tuvieron valores intermedios que no difirió de ninguno ($1,38 \pm 0,28 \times 10^{-3}\text{ mm}^3$). No se observaron diferencias entre grupos en la inmunorreactividad de C-Fos en el bulbo olfatorio accesorio ni en el núcleo olfatorio anterior. En este momento se está finalizando la comparación de los datos de otras secciones, lo que se retrasó por las razones explicadas.

Estos resultados demuestran el rol de las señales químicas, especialmente el olor, dado que la presencia de la madre se vinculó con la activación neural en el bulbo olfatorio. Esto, asociado a los resultados anteriores, demuestra que las señales olfativas de la madre son importantes para el proceso de reconocimiento. A pesar de que los corderos tienen una mayor actividad a esta edad, mayor distancia con su madre y mayor cantidad de actividades de interacción con otros corderos que cerca del parto, las vías olfativas siguen cumpliendo un rol relevante en la interacción con su madre.

Experimentos 2 y 3: Señal olfativa y separación madre-cría a diferentes edades

A los 30 días de edad, los corderos vocalizaron más cuando tuvieron lana de su madre que cuando fue lana de una oveja ajena ($52,1 \pm 3,6$ vs $37,3 \pm 3,4$; $P = 0,04$), siendo el valor del grupo sin lana intermedio ($40,2 \pm 3,6$). No hubo diferencias en ninguna de las otras variables.

A los 90 días de edad, el número de vocalizaciones tendió a diferir entre los grupos ($118,2 \pm 23,1$, $103,7 \pm 23,4$ y $83,6 \pm 23,1$ para lana de la madre, lana de otras ovejas o máscara vacía respectivamente; $P = 0,097$).

En ambas edades, no hubo diferencias entre grupos en las temperaturas rectal y superficiales del ojo, hocico y orejas, ni en de las frecuencias cardíaca y respiratoria.

Estos resultados demuestran que los corderos de entre uno y tres meses reconocen las señales químicas contenidas en la lana de sus madres, identificando las características particulares, y diferenciándola de las de la lana de otras ovejas. Además, los corderos que olieron ligeramente la lana de su madre emitieron más vocalizaciones en una situación estresante, posiblemente buscando protección.

Conclusiones y recomendaciones

Las neuronas en el sistema olfatorio de corderos se activan más cuando estos son expuestos a su madre que a otra oveja

lactante o que no reciben estímulo social. También se determinó que los corderos de 60 y 90 días de edad reconocen las señales olfatorias maternas y presentan un cambio conductual cuando separados de su madre y expuestos al olor de la lana materna. Estos resultados habilitan a profundizar los trabajos en que se utiliza lana de la madre como posible señal moduladora del comportamiento de los corderos, desarrollando estrategias para su aplicación práctica.

Referencias bibliográficas

- Alexandre-Pires, G., Martins, C., Galvão, A. M., Miranda, M., Silva, O., Ligeiro, D., y Ferreira-Dias, G. (2017). Understanding the Inguinal Sinus in Sheep (*Ovis aries*)—Morphology, Secretion, and Expression of Progesterone, Estrogens, and Prolactin Receptors. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1516.
- Lenochova, P., Roberts, S. C., y Havlicek, J. (2009). Methods of human body odor sampling: the effect of freezing. *Chemical Senses*, 34(2), 127-138.
- Nowak. 1991. Senses involved in discrimination in merino ewes at close contact and from distance by their newborn lambs. *Appl Anim Behav Sci* 42:357-366.
- Nowak. 2006. Suckling, milk, and the development of preferences towards maternal cues by neonates: from early learning to filial attachment? En: Brockmann et al. (Eds.), *Advances in the study of behaviour*. Elsevier, Amsterdam, pp.1-358.
- Pérez-León et al. 2006. Reducing mother young separation distress by inducing ewes into oestrous into day of weaning. *Anim. Welf.* 15:383–389.
- Poindron et al. 2007. Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol* 49:54-70.
- Poindron, LeNeindre. 1980. Endocrine and sensory regulation of the maternal behavior in the ewe. *Adv Study Behav* 11:75-119.
- Sales et al. 2020. Maternal nutrition and antioxidant supplementation: Effects on mother–young behaviors in a Patagonian sheep extensive grazing system. *Appl Anim Behav Sci* 228:105010.
- Searby, Jouventin. 2003. Mother–lamb acoustic recognition in sheep: a frequency coding. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:1765–1771.
- Sébe et al. 2007. Establishment of vocal communication and discrimination between ewes and their lamb in the first two days after parturition. *Dev Psychobiol* 49:375-386.
- Slee, Springbett. 1986. Early post-natal behaviour in lambs of ten breeds. *Appl Anim Behav Sci* 15:229-240.
- Smith et al. 1966. The “critical period” in the attachment of lambs and ewes. *Anim Behav* 14:120-125.
- Ungerfeld 2020. Bienestar en animales de producción: la investigación nacional, ¿acompaña las exigencias internacionales en el tema?. *Veterinaria (Montevideo)* 56:e201.
- Ungerfeld et al. 2008. Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. *Anim Reprod Sci* 103:271-277.
- Ungerfeld et al. 2018. Preference for the mother does not last long after weaning at 3 months of age in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 205:28-33.
- Val-Laillet et al. 2004. A full belly and colostrum: two major determinants of filial love. *Dev Psychobiol* 45:163-173.
- Val‐Laillet et al. 2009. Behavioural and neurobiological effects of colostrum ingestion in the newborn lamb associated with filial bonding. *Eur J Neurosci* 30:639-650.
- Freitas-de-Melo et al. 2017. Low pasture allowance until late gestation in ewes: behavioural and physiological changes in ewes and lambs from lambing to weaning. *Animal* 11:285-294.
- Freitas-de-Melo et al. 2018a. Influence of low pasture allowance during pregnancy on the attachment between ewes and their lambs at birth and during lactation. *Appl Anim Behav Sci* 199:9-16.
- Freitas-de-Melo et al. 2018b. Early mother–young relationship and feeding behaviour of lambs are unaffected by low pasture allowance until the beginning of the last third of gestation in single bearing ewes. *Anim Prod Sci* 58:930-936.
- Freitas-de-Melo et al. 2018c. Restricción alimenticia durante la gestación y vínculo madre–cría en ovinos: una revisión. *Veterinaria (Uruguay)* 54:19-28.
- Freitas-de-Melo et al. 2019. Behavioral pattern in Texel x Corriedale terminal crossbreeding: maternal behaviour score at birth, lambs’ feeding behaviors and behavioral responses of lambs to abrupt weaning. *J Vet Behav* 30:9-15.
- Freitas-de-Melo, Ungerfeld. 2016. Destete artificial en ovinos: respuesta de estrés y bienestar animal. Revisión. *Rev Mex Cienc Pec* 7:361-375.
- Freitas-de-Melo, Ungerfeld. 2020 The sex of the offspring affects the lamb and ewe responses to abrupt weaning. *Appl Anim Behav Sci* 229:105008.
- Guesdon et al. 2016 Behavioral evidence of heterospecific bonding between the lamb and the human caregiver and mapping of associated brain network. *Psychoneuroendocrinol* 71:159-69
- Johnson et al. The sheep brain atlas. En: *Brain biodiversity bank*, Michigan State University. (<https://msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>. Fecha de consulta: 2 de junio de 2020).

- Lévy, Keller. 2008. Neurobiology of maternal behavior in sheep. En: Brockman HJ et al. (Eds.), *Advances in the study of behavior*. Elsevier, Amsterdam, 399-437.
- Lindsay, Fletcher. 1968. Sensory involvement in the recognition of lambs by their dams. *Anim Behav* 16:415-417.
- Menant et al. 2016. Régulation des émotions chez l'animal d'élevage : focus sur les acteurs neurobiologiques. *INRA Prod Anim* 29:241-254.
- Menant et al. 2018 First evidence of neuronal connections between specific parts of the periaqueductal gray (PAG) and the rest of the brain in sheep: placing the sheep PAG in the circuit of emotion. *Brain Struct Funct* 223:3297-3316.
- Meurisse et al. 2009 Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J Chem Neuroanat.* 2009 Mar;37(2):87-97.
- Nowak et al. 1997. Development of a preferential relationship with the mother by the newborn lamb: importance of the sucking activity. *Physiol Behav* 62:681-688.
- Nowak et al. 2007. Perinatal visceral events and brain mechanisms involved in the development of mother–young bonding in sheep. *Horm Behav* 52:92-98.
- Nowak et al. 2011. Suckling, oxytocin and the development of attachment behaviour in infants. *Proc 43rd Eur Brain Behav Soc*, 9–12, Sevilla, España, 42.
- Nowak et al. 2016. Diversité des relations affiliatives chez les ovins en situation d'élevage: mécanismes comportementaux et neurobiologiques. *INRA Prod Anim* 29: 267-278.
- Nowak. 1990. Mother and Sibling discrimination at a distance by three to seven day old lambs. *Dev Psychobiol* 23:285-295.
- Broad et al. 1993. Changes in oxytocin immunoreactivity and messenger RNA expression in the sheep brain during pregnancy, parturition and lactation and in response to oestrogen and progesterone. *J Neuroendocrinol* 5:435-444.
- Cook. 2004. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. *Physiol Behav* 82:751-762.
- Da Costa et al. 1997. Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain. *Brain Res Mol Brain Res* 46:63-76.
- Dwyer. 2017. Reproductive management (including impacts of prenatal stress on offspring development). In: Ferguson et al. (Eds.), *Advances in Sheep Welfare*. Elsevier, UK, 131–149.
- Ewbank. 1967. Nursing and suckling behaviour amongst Clun Forest ewes and lambs. *Anim Behav* 15:251-258.
- Ferreira et al. 2000. Learning of olfactory cues is not necessary for early lamb recognition by the mother. *Physiol Behav* 69:405-412.
- Fletcher. 1971. Relations between frequency of suckling, lamb growth and post-partum oestrus behaviour in ewes. *Anim Behav* 19:108-111.
- Freitas-de-Melo et al. 2013. Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal* 8:1367-1373.
- Freitas-de-Melo et al. 2015. Mother-young bonding in grazing ewes: Effects of sex and food restriction in pregnancy. *Appl Anim Behav Sci* 168:31-36.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)