

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**APLICACIÓN DE GONADOTROPINA CORIÓICA EQUINA Y RITMO CIRCADIANO DE LA
TEMPERATURA SUPERFICIAL Y CONDUCTA DE CARNEROS ESTABULADOS DURANTE
LA PRIMAVERA**

Por

**DAMIÁN PETTINARI, Gastón
VIDAL ASTELLANO, Octavio Bruno**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Paul Ruiz

Segundo miembro (Tutor): _____
Livia Pinto-Santini

Tercer miembro:



Dra. Carolina Fiol



Cuarto miembro: _____
Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha: 5/08/2021

Autores: _____
Br. Gastón Damián

Br. Octavio Vidal

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Livia Pinto-Santini y co-tutor Rodolfo Ungerfeld, por su dedicación y apoyo brindado a lo largo de este trabajo.

A Milton, quien nos ayudó en el manejo de los carneros en el predio de la Facultad.

A la Facultad de Veterinaria toda, quien nos formó como profesionales.

Especialmente a nuestra familia, que apoyaron en las buenas y las otras.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN²

AGRADECIMIENTOS³

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS^{Error! Bookmark not defined.}

RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA ^{Error! Bookmark not defined.}	
2.1 Ritmos circadianos. Componentes del sistema circadiano.....	10
2.2. Características de ritmo circadiano: mesor, amplitud, acrofase, robustez.....	11
2.3. Conductas básicas de los ovinos.....	12
2.4. Ritmos circadianos de las actividades en ovinos.....	12
2.5. Regulación de la temperatura corporal: relación entre el sistema homeostático y el sistema circadiano.....	14
2.6. Temperatura superficial como metodología para estimar-predicir la temperatura corporal....	15
2.7. Acción de la eCG y estacionalidad reproductiva	15
3. HIPÓTESIS ^{Error! Bookmark not defined.}	
4. OBJETIVOS ^{Error! Bookmark not defined.}	
5. MATERIALES Y METODOS.....	18
5.1 Lugar de estudio, animales y manejo.....	18
5.2 Variables ambientales	18
5.3 Tratamiento y diseño del experimento ^{Error! Bookmark not defined.}	
5.4 Variables evaluadas	20
5.5 Analisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS ^{Error! Bookmark not defined.}	
6.1 Concentración de testosterona ^{Error! Bookmark not defined.}	
6.2 Actividades efectuadas por los carneros ^{Error! Bookmark not defined.}	
6.3 Temperatura del ojo	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	30
9. BIBLIOGRAFIA.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Características del ritmo circadiano del cortisol en humanos (Sabater Gárrix, 2019)

Figura 2. Histograma acumulativo de la rumia en 4 ovejas observadas durante 8 días (Gordon & McAllister, 1970).

Figura 3. Variación de la temperatura ambiental y humedad relativa durante el primer y segundo muestreo.

Figura 4. Porcentaje del tiempo dedicado a las actividades evaluadas en varios periodos del día.

Figura 5. Variación de la temperatura central, de la pupila y ojo a lo largo del experimento

Cuadro 1. Medias estimadas $\pm$ error estándar y principales efectos de la aplicación de eCG o no, periodo del día y la interacción tratamiento x tiempo, sobre el porcentaje del tiempo que los carneros dedican a las actividades registradas

Cuadro 2. Medias estimadas $\pm$ error estándar y principales efectos de la aplicación de eCG o no de las características del ritmo circadiano del tiempo dedicado por los carneros a las actividades registradas

Cuadro 3. Medias estimadas, error estándar y principales efectos de la aplicación de eCG o no, para la determinación de la temperatura en los puntos diferentes puntos de referencia (Centro, Pupila, Ojo)

Cuadro 4. Medias estimadas, error estándar y principales efectos de la aplicación de eCG o no de la característica del ritmo circadiano de la temperatura.

RESUMEN

La ritmicidad circadiana de algunas funciones fisiológicas y conductuales de los ovinos pueden ser moduladas por los esteroides sexuales. Durante la estación no reproductiva, los carneros presentan una menor concentración de testosterona; sin embargo, la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) estimula su secreción independientemente de la estación reproductiva. Con el objetivo de determinar el efecto de la aplicación de eCG en el ritmo circadiano del comportamiento y la temperatura superficial de carneros estabulados durante la primavera (estación no-reproductiva). Se utilizaron 20 carneros Corriedale que fueron asignados al azar a uno de dos tratamientos: a) CeCG: administración de 1000 UI de eCG vía intramuscular y b) CON: control, sin aplicación de eCG. Todos los carneros fueron manejados en las mismas condiciones de alimentación y ambiente (a cielo abierto). La concentración de testosterona fue mayor en los carneros CeCG que CON ($32,7 \pm 0,7$ nmol/L vs $5,8 \pm 0,7$ nmol/L; $P < 0,0001$). La temperatura superficial fue más baja en el grupo CeCG ($P < 0,05$), pero las características del ritmo circadiano no fueron afectadas por el tratamiento, estando la acrofase para estas variables entre las 09:30 y 12:30 h. El tiempo dedicado a efectuar cada actividad varió de acuerdo al periodo del día ($P < 0,0001$), con excepción del tiempo durmiendo, que solo presentó una tendencia ($P = 0,10$). La administración de eCG adelantó la acrofase del tiempo dedicado a comer (CeCG = $09:48 \pm 00:16$

vs CON = 10:20 $\pm$ 00:16) y dormir (CeCG = 21:39 $\pm$ 00:57 vs CON = 02:02 $\pm$ 01:06) ($P < 0,05$ en ambas variables). Además, los carneros CecG durmieron menos que los CON ($P < 0,05$). La aplicación de eCG aumentó la concentración de testosterona y modificó la ritmicidad del ciclo comiendo y durmiendo, sin afectar la ritmicidad de la temperatura superficial de los carneros durante la primavera.

SUMMARY

The circadian rhythmicity of some physiological and behavioral functions of sheep can be modulated by sex steroids. During the non-breeding season, the rams have a low concentration of testosterone. However, the application of equine chorionic gonadotropin (eCG) stimulates testosterone secretion, regardless of the reproductive season. In order to determine the effect of the application of eCG on the circadian rhythm of behavior and the surface temperature of rams housed during the non-reproductive season, 20 Corriedale rams were randomly assigned to one of two treatments: a) CeCG: administration of 1000 IU of eCG intramuscularly and b) CON: control, without application of eCG. All the rams were managed under the same feeding and environmental conditions (outdoors). Testosterone concentration was greater in CeCG than CON rams (32.7 ± 0.7 nmol/L vs 5.8 ± 0.7 nmol/L; $P < 0.0001$). The surface temperature was lower in the CeCG than in the CON rams ($P < 0.05$). However, the characteristics of the circadian rhythm were not affected by the treatment, being the acrophase for these variables between 09:30 and 12:30 h. The time spent performing each activity varied according to the period of the day ($P < 0.0001$), except for the trend presented in the sleeping activity ($P = 0.10$). There was an advancement of the acrophase of the time spent eating (CeCG = $09:48 \pm 00:16$ vs CON = $10:20 \pm 00:16$) and sleeping (CeCG = $21:39 \pm 00:57$ vs CON = $02:02 \pm 01:06$) in the CeCG group ($P < 0.05$ in both variables). Furthermore, CeCG rams slept less than CON rams ($P < 0.05$). The application of eCG increased the testosterone concentration and modified the rhythmicity of eating and sleeping times of the rams, without affecting the rhythmicity of the surface temperature.

1. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos presentan comportamientos fisiológicos y biológicos oscilatorios a lo largo del tiempo. Dentro de estos, la existencia de un cambio regular y natural de los seres vivos ante los ciclos de luz/oscuridad, que se presentan durante las 24 h del día, ha sido probada y constituye un rasgo evolutivo que permite a todos los seres vivos ajustar su fisiología y conducta a los momentos más idóneos del día. Estos ciclos, denominados circadianos, están regulados por un oscilador o “reloj” interno ubicado en el hipotálamo, precisamente en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Refinetti, 2016). La duración del día y la noche (señales fóticas) es la principal señal de sincronización. Sin embargo, también existen otros moduladores no-fóticos que actúan más finamente como un mecanismo de calibración del reloj, entre ellos se incluyen la temperatura ambiente, el ejercicio, la socialización (Refinetti, 2016). La forma exacta de comunicación entre los sincronizadores no-fóticos y los NSQ no es del todo clara. No obstante, se piensa que pueden operar a través de neurotransmisores, metabolitos u hormonas, los cuales directa o indirectamente, transmiten la información al reloj (Webb, Antle & Mistlberger, 2014; Mendez-Hernandez, Escobar & Ruud, 2020). Recientemente se reportó que la etapa del ciclo estral modifica el ritmo circadiano de la secreción de cortisol y del metabolismo energético de las ovejas, lo que pudiera indicar que los esteroides sexuales son moduladores de los ritmos circadianos en la especie (Pinto-Santini & Ungerfeld, 2019).

La investigación sobre los ritmos circadianos en animales de producción es escasa. No obstante, la información derivada de la ritmicidad fisiológica y conductual de los ovinos puede ser de interés a la hora de pensar en cambios en el manejo animal que promueva mejoras productivas y/o el bienestar de los animales, diferenciando entre machos y hembras, al considerar entender la modulación de los esteroides sexuales sobre los mismos, o de acuerdo a la variación estacional en las concentraciones de los mismos.

Las actividades conductuales permiten clasificar a las especies en diurnas o nocturnas. Los ovinos son principalmente diurnos (Piccione, Caola & Mortola, 2008) y en general presentan sus picos de actividad en el amanecer y el anochecer, principalmente asociados con el pastoreo (Gerpe, 2014). El descanso echado, con y sin rumia, se presenta en varios momentos del día, pero la rumia tiene mayor incidencia durante la noche (Gordon & McAllister, 1970; Kieltyka-Kurc, Rydel-Gigauri & Gorecki, 2013). Los ovinos duermen poco, apenas unas 4,5 h al día (Fraser, 1980). Los esteroides sexuales están relacionados con el despliegue de conductas que favorecen la reproducción en ambos sexos. En los carneros, la mayor concentración de testosterona se relaciona directamente con el comportamiento sexual y con la expresión de conductas agresivas (Ungerfeld, Clemente & Orihuela, 2018), por lo que es probable que la concentración de testosterona pueda afectar la expresión de conductas básicas (comer, beber, rumiar, descansar, dormir) en los machos.

La regulación de la temperatura responde tanto a los ritmos u oscilaciones circadianas como a la regulación homeostática, estando ambos sistemas integrados (Refinetti, 2020). En otras especies (hombre, perro, vaca, caballo) se han presentado investigaciones sobre ritmos circadianos en temperatura superficial, dando como resultados patrones que se repiten diariamente, aumentos de temperatura desde el amanecer, llegando a un pico máximo en el atardecer donde comienza a bajar, hasta volver a subir al amanecer siguiente (Aschoff, 1965; Gerpe, 2014). La ritmicidad de la temperatura a nivel del ojo y otras zonas del rostro en ovinos, hasta donde se conoce, no ha sido estudiada.

La aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) promueve la secreción de testosterona, independientemente de la estación del año (reproductiva o no-reproductiva), en carneros (Ungerfeld et al., 2018). Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo evaluó si la concentración de testosterona, promovida o no por la aplicación de eCG, modifica el ritmo circadiano de la

temperatura superficial, medida a nivel del ojo, y de las conductas básicas (comer, rumiar, estar echados, estar parados, dormir) de carneros estabulados durante la estación no reproductiva.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Ritmos circadianos. Componentes del sistema circadiano

Todos los organismos vivos poseen de forma natural un comportamiento rítmico, que incluye procesos bioquímicos, fisiológicos y de conducta, y que constituyen parte de sus mecanismos de adaptación a las variaciones ambientales periódicas del planeta tierra (Golombek, 2007). Esta ritmicidad se conoce desde la antigüedad, aunque los primeros estudios formales en el área se realizaron en plantas, en el siglo XVIII, y posteriormente en animales, durante el inicio del siglo pasado (Golombek, 2007).

Un ritmo biológico puede definirse como la variación regular de una función biológica en el curso del tiempo. Los ritmos, cuya periodicidad fluctúa en alrededor de 24 h ("circa/cerca" 24 h), son denominados circadianos. Aquellos ritmos que tienen un periodo mayor a los circadianos se los

clasifica como ritmos infradianos (ej. ciclo estral de las hembras, estacionalidad reproductiva), y aquellos ritmos con un periodo menor a los circadianos se los llama ritmos ultradianos (ej. frecuencia cardiaca) (Refinetti, 2016).

Los ritmos circadianos están regulados por relojes biológicos, integrados por moléculas (genes reloj) que interactúan con las células de todo el cuerpo. A su vez, estos relojes biológicos están regulados por un reloj maestro ubicado en los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ), los cuales pueden sincronizarse por señales ambientales, también conocidas como vías de entrada al reloj (Golombek, 2007). Son dos núcleos pequeños que constan de unos pocos miles de neuronas. Se encuentran a cada lado del tercer ventrículo y en posición dorsal con respecto al quiasma óptico. Debido a su actividad rítmica son los responsables de la gran parte de ritmos circadianos de mamíferos. Esto ha sido demostrado en estudios de lesión de dichos núcleos y posterior registro de actividades fácilmente observables, como la actividad motora o la temperatura corporal. En todos los casos la lesión induce pérdida de la ritmicidad en animales que anteriormente mostraban ritmos circadianos (Gerpe, 2014).

Mendoza (2009) señaló que cuando un organismo es aislado por una u otra razón del contacto periódico con las señales ambientales, los ritmos circadianos continúan oscilando normalmente con una periodicidad que se acerca a las 24 h, pero dejan de sincronizarse con el ambiente exterior, entrando en un estado de 'free running'. Esto evidencia que existe una regulación endógena que mantiene la ritmicidad a la cual se hace referencia (Hastings, 1997; Sabater Gárrix, 2019).

Los relojes circadianos presentan tres propiedades. La primera es que son de carácter endógeno, es decir, los organismos son capaces de generarlos por ellos mismos. La segunda es que tienen la capacidad de sincronizarse con las condiciones ambientales. Por último, presentan la capacidad de compensar los cambios de temperatura. Debido a que los relojes biológicos son poco o nada accesibles, llegando incluso a desconocerse donde se encuentran según la especie estudiada, se recurre a medidas indirectas a la hora de estudiarlos. Como no se puede estudiar el propio reloj, se estudian sus vías de salida. Entre estas medidas se encuentran la actividad motora en general, los ritmos de alimentación y bebida, la temperatura, tanto central como periférica, o la frecuencia cardiaca. En estos casos lo ideal es estudiar más de uno de estos ritmos a la vez en un mismo sujeto (Gerpe, 2014).

Entre los sincronizadores (zeitgebers) del reloj biológico, el más importante es el ciclo de luz-oscuridad (sincronizador fótico), aunque los horarios de las comidas, la actividad física, los horarios de sueño y los contactos sociales también actúan como sincronizadores no fóticos (Garaulet & Madrid, 2009; Refinetti, 2016). Estos últimos pueden ser tanto salidas como entradas del sistema circadiano, por lo que también han sido denominados 'tomadores del tiempo' (zeitnehmer) (Roenneberg & Merrow, 1998).

Los sincronizadores fóticos han sido abundantemente estudiados en diferentes especies, incluidos los ovinos, y se conoce que operan a través del tracto retino-hipotalámico, formado por axones originados en una subpoblación de células ganglionares de la retina, que no participan en la formación de imágenes conscientes (Refinetti, 2016). Estas células contienen un foto-pigmento, melanopsina, cuya sensibilidad es máxima a la luz azul de 460-480 nm, que no está presente en bastones y conos (Berson, Dunn & Takao, 2002) e informan a los NSQ sobre el ciclo de luz/oscuridad del ambiente. El mecanismo exacto de acción de los sincronizadores no fóticos y/o zeitnehmer no es claro, sin embargo, podrían actuar a través de un mecanismo de retroalimentación e incluir diversos metabolitos, hormonas y neurotransmisores (Webb et al., 2014). Recientemente se reportó que el ritmo circadiano de la secreción de cortisol y del metabolismo energético de las ovejas difiere de acuerdo a la fase del ciclo estral (Pinto-Santini & Ungerfeld, 2019), lo que pudiera indicar que los esteroides sexuales son moduladores de los ritmos circadianos en la especie. No

obstante, la información al respecto es escasa y hasta donde se conoce, no hay estudios en los machos.

2.2 Características del ritmo circadiano: mesor, amplitud, acrofase y robustez

Los componentes de una variable rítmica pueden analizarse mediante una función cosenoidal. Las características de esta función y que son usados para describir los ritmos circadianos son: a) período: (τ), definido como el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos, es decir, la duración de un ciclo completo; b) mesor: valor medio de la variable estudiada, calculado a lo largo de un período completo; c) amplitud: diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el período; d) fase: valor instantáneo de una variable biológica en un momento dado. Para describir la fase, lo más usual es determinar la hora del día en que la variable estudiada alcanza su valor máximo a lo largo del ciclo, punto denominado “acrofase” (Sabater Gárrix, 2019); e) robustez: es considerada la fuerza o firmeza del ritmo, por lo que a mayor robustez mayor confianza a los datos obtenidos. En la Figura 1 se ejemplifican gráficamente las características del ritmo circadiano para el cortisol plasmático en humanos.

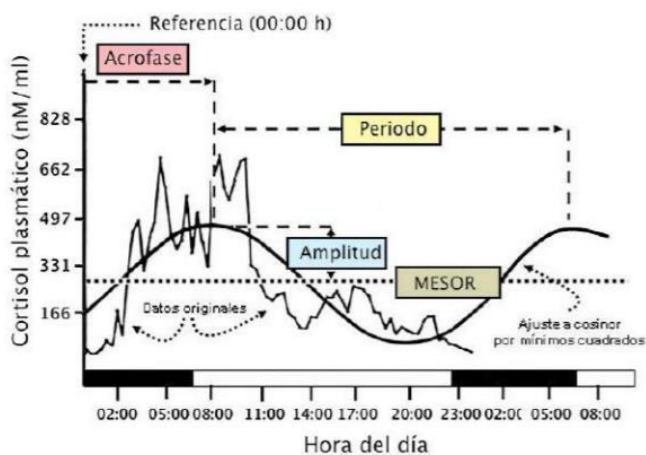


Figura 1. Características del ritmo circadiano del cortisol en humanos (tomado de Sabater Gárrix, 2019)

2.3 Conductas básicas de los ovinos

El comportamiento de los ovinos está fuertemente relacionado con el hecho de que son rumiantes gregarios, es decir que viven en grupos (Kieltyka-Kurc et al., 2013). Las conductas de los animales se pueden clasificar en aquellas que son básicas para la supervivencia, sexuales o reproductivas, maternas e ingestivas. Dentro de las básicas se incluyen: comer, beber, rumiar, estar de pie y/o caminar, estar echados y/o en descanso, orinar, defecar y dormir. La definición de estas actividades basado en los etogramas sobre ovinos, son: a) echado/acostado: el animal se encuentra acostado para descansar, dormir o rumiar; b) parado: simplemente de pie, miembros anteriores y posteriores extendidos; c) comiendo/pastando: los animales tienen la cabeza hacia abajo, para la aprensión de los alimentos, y en esa posición se observan efectuando movimientos de mandíbula (masticación) entre bocados; d) rumiando: caracterizada por una masticación rítmica visible, precedida de una regurgitación y posterior re-deglución del bolo alimenticio, no asociada a la ingestión de alimento, por lo que la masticación se hace con la cabeza recta (Fernández Carmona et al., 2017); e) durmiendo: se considera que un ovino duerme cuando se encuentra en posición acostada con la cabeza apoyada sobre el flanco y los ojos cerrados (Ternman, 2014).

2.4 Ritmos circadianos de las actividades en ovinos

La actividad circadiana del comportamiento ovino está determinada por factores ambientales, incluyendo la disponibilidad de alimentos y el ciclo de luz/oscuridad (Piccione, Giannetto, Caola & Casella, 2010), por lo que el ritmo circadiano del comportamiento ovino depende de la estación del año. Gerpe (2014) reportó que existen dos picos de actividad, al amanecer y al anochecer en ovinos. Las ovejas están activas durante 16 horas y duermen unas 4,5 horas por día (Fraser, 1980) es decir, presentan un comportamiento mayoritariamente diurno (Piccione et al., 2008). Se encontró que el pastoreo generalmente comienza al amanecer y se continua, en intervalos, durante el día, terminando al anochecer. Las horas menos activas de los ovinos se presentan al mediodía y a medianoche (Arnold, 1962).

Por otro lado, se ha descrito que las ovejas presentan varios periodos de rumia a lo largo del día (Figura 2), pero con mayor frecuencia durante la noche (entre las 21:00 y 05:00 h del día) (Gordon & McAllister, 1970; Kieltyka-Kurc et al., 2013). Es común que el ovino dedique cuatro a diez horas a la rumia en las 24 horas. Esto puede ser repartido dentro de quince a veinte períodos durante las 24 horas, con descansos de duración variada entre esos momentos. Los ovinos tienden a beber agua de una a cuatro veces por día, dependiendo de la temperatura ambiente, la ingestión de alimento y el tipo de alimento. El sueño profundo es extremadamente raro en ovinos adultos, en parte debido a las casi perpetuas contracciones y movimientos del rumen y del retículo, los que requieren que el esternón esté en una posición determinada. El sueño profundo puede darse en el animal echado sobre su costado o relajado sobre su esternón. Esto puede explicar por qué algunos ovinos son observados en sueño profundo relativo solamente cuando están recostados sobre un fardo, una rueda o un cerco, los cuales ayudarían a mantener al esternón en una posición normal en relación al rumen y al retículo (Cunningham & Acker, 1998).

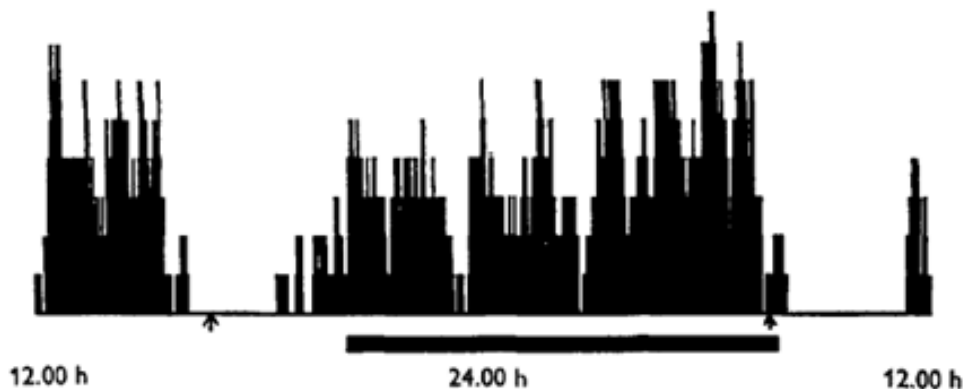


Figura 2. Histograma acumulativo de la rumia en 4 ovejas observadas durante 8 días. La banda negra marca las horas de oscuridad. Las flechas marcan horario de alimentación (07:45 y 16:45) (tomado de Gordon & McAllister, 1970).

La concentración de testosterona se relaciona directamente con el comportamiento sexual y con la expresión de conductas agresivas en carneros. Los incrementos en la secreción de testosterona se relacionan con un mayor despliegue de conductas sexuales de cortejo hacia las hembras (olfateo ano-genital, aproximaciones laterales) (Ungerfeld et al., 2018). Adicionalmente, Lacuesta y Ungerfeld (2015) reportaron concentraciones superiores de testosterona antes de la estación reproductiva en carneros dominantes que en carneros subordinados. Las conductas sexuales y de competencia presentadas en carneros con mayor testosterona probablemente también afecten sus conductas básicas (comer, beber, rumiar, descansar), probablemente dedicando menos tiempo a estas actividades, para aumentar el tiempo dedicado a las conductas sexuales y de competencia/dominancia.

2.5 Regulación de la temperatura corporal: relación entre el sistema homeostático y el sistema circadiano

La regulación de la temperatura responde tanto a los ritmos u oscilaciones circadianas como a la regulación homeostática, estando ambos sistemas integrados. El sistema circadiano genera una señal de ritmo con amplitud relativamente grande, por lo que, al mismo tiempo, pero de forma independiente, el sistema termorregulatorio establece los límites de variación permitida dentro de esa amplitud (Refinetti, 2020). El animal homeotérmico es capaz de mantener un equilibrio entre producción y la pérdida de calor para mantener su temperatura constante (Arfuso et al., 2016). El cuerpo produce continuamente calor, el que es disipado a través de la superficie de varias formas (Piccione et al., 2005). En los mamíferos, la temperatura central está homeostáticamente regulada en torno a 37-39 °C a pesar de las grandes variaciones que puedan ocurrir en la temperatura ambiente. Oscilaciones diarias de hasta 2 o 3 °C por encima y por debajo del área del punto de ajuste termorregulador son típicas de la fisiología de los mamíferos (Piccione & Refinetti, 2003).

Según Gerpe (2014), la temperatura corporal tiene un ritmo circadiano más marcado que el comportamiento, empezando a aumentar al amanecer hasta alcanzar un pico máximo aproximadamente al atardecer, donde comienza a disminuir nuevamente. Piccione y Refinetti (2003) reportaron que la acrofase (hora en que ocurre el valor máximo) de la temperatura corporal ocurre entre las 09:00 y las 14:00 h. Sobre la regulación homeostática, los ovinos como especie endoterma (cuya temperatura es regulada por la actividad metabólica) presentan temperaturas corporales cercanas a los 39 °C (Refinetti, 2016). Para mantener la temperatura dentro del rango considerado fisiológico se activan varios mecanismos de termólisis y termogénesis. La vasoconstricción periférica es un mecanismo que ocasiona que la temperatura del animal se mantenga, y por el contrario la vasodilatación genera pérdida de temperatura. A su vez, hay otros factores que modulan la vasoconstricción. Por ejemplo, la testosterona tiene efecto vasodilatador periférico (Jones, Pugh, Jones, Channer, 2003). La vasodilatación periférica produce un aumento del flujo sanguíneo cutáneo, lo que permite perder calor, por lo que en un primer momento aumenta la temperatura periférica, para luego disminuir (Someren, 2011). Aunque ha sido relativamente poco descrito, la homeostasis reguladora de la temperatura limita la oscilación del sistema circadiano, reduciendo su amplitud, por lo que la temperatura corporal a lo largo del día es resultado de la integración entre ambos sistemas, el circadiano y el termorregulador (Refinetti, 2020). Los esteroides pueden modular algunos ritmos circadianos, entre ellos el metabolismo de la hembra (Pinto-Santini & Ungerfeld, 2019), por lo que ya sea por promover cambios en el metabolismo o mediante la promoción de la pérdida de calor, la concentración de testosterona también puede afectar la temperatura corporal de los machos y su ritmicidad diaria.

Hasta ahora solo Pinto-Santini & Ungerfeld. (2019) y Giannetto et al. (2020) reportaron la ritmicidad circadiana de la temperatura superficial en animales de producción (ovejas y, caballos y cabras, respectivamente), pero la ritmicidad de la temperatura a nivel del ojo y otras zonas del rostro en ovinos, hasta donde se conoce, no ha sido estudiada. También se ha demostrado que la pérdida de calor muestra fluctuaciones diurnas determinada por conducta, evaporación, convección y radiación (Aschoff & Heiss, 1972). Los cambios en la pérdida de calor por convección y radiación se deben principalmente a variaciones en el flujo sanguíneo de la piel, con los consiguientes cambios en la temperatura de la piel.

2.6 Temperatura superficial como metodología para estimar la temperatura corporal

La evaluación de la temperatura corporal representa una valiosa herramienta para monitorear el estado fisiológico, el bienestar y las respuestas al estrés de los animales. El control de la temperatura es una parte importante de la medicina clínica, que permite la detección temprana de

infecciones, respuestas inflamatorias sistémicas, enfermedades inmunomediadas, neoplasias y shock (Battersby, Murphy, Tasker & Papsouliotis, 2006).

Existen diferentes formas de medir la temperatura corporal. La más usada es la temperatura rectal, con el uso de termómetros de mercurio o digitales, lo cual requiere la captura y sujeción de los animales, lo que de por sí mismo puede ser estresante en ovinos y en consecuencia causar incrementos de la temperatura corporal (Maloney y Blache, 2017). Actualmente hay nuevas tecnologías disponibles para estimar la temperatura de los animales, incluyendo el uso de cámaras infrarrojas que miden la radiación infrarroja emitida por animales de cuerpo caliente, y por lo tanto permiten medir la temperatura superficial sin interferir con la actividad del animal (McCafferty, 2007). Esta herramienta ha sido usada en animales silvestres (Narayan, Perakis & Meikle, 2019) y animales de producción (Edgar, Lowe, Paul & Nicole, 2011; George, Godfrey, Ketring, Vinson & Willard, 2014; Menant et al., 2020; Sykes et al., 2012) para determinar la temperatura superficial en diferentes zonas de la superficie corporal. No obstante, la presencia de cabello y, en particular, del vellón en ovinos, ocasiona considerables dificultades en la aplicación de la termometría infrarroja (Katsoulos et al., 2016), por lo que hacer la medición en el área rostral, precisamente en el ojo, brindaría mayor precisión. En tal sentido, George et al. (2014) demostraron una alta correlación de la temperatura superficial determinada a nivel del ojo con la temperatura corporal central en vacunos de carne y ovejas de pelo. Se debe aclarar que la temperatura superficial siempre es menor a la temperatura rectal (Morgan, 1997).

2.7 Acción de la eCG y estacionalidad reproductiva

La eCG es una hormona glucoproteica secretada por las copas endometriales de la yegua entre los días 55 y 130 de gestación (Murphy & Martinuk, 1991). Es una hormona con efecto FSH y LH, que ha sido ampliamente utilizada en ovejas y vacas para inducir el crecimiento folicular y ovulación (Ungerfeld et al., 2018). En los machos la aplicación de eCG induce la liberación de las hormonas FSH/LH, las cuales regulan la producción de gametos y hormonas testiculares, como la testosterona. Las células de Leydig, que se encuentran adyacentes a los túbulos seminíferos, tienen receptores para la LH, que las estimula a producir testosterona (Hafez & Habez, 2002).

Los ovinos presentan un período reproductivo estacional, que se manifiesta principalmente en las hembras, cuando el fotoperiodo pasa de creciente a decreciente, es decir, cuando los días comienzan a ser más cortos (desde el inicio del verano hasta el otoño) (Malpaux, Robinson, Brown & Karsch, 1988). Los machos se ven menos afectados que las hembras. (Ungerfeld et al., 2018) Sin embargo, en la raza Corriedale, en la estación no reproductiva, se reducen tanto la concentración de testosterona como la calidad espermática del semen de los carneros (Pérez-Clariget, Forsberg, Rodríguez-Martínez, 1997; Ungerfeld, 2012). La administración de eCG induce un aumento de la secreción de testosterona en carneros, independientemente de la estación del año (Ungerfeld et al., 2018).

El principal sincronizador de los ritmos circadianos es el fotoperiodo (ciclo luz/oscuridad). No obstante, el ritmo puede ser modificado (“enmascaramiento”) o sincronizado (“arrastre” del ciclo) por otros factores ambientales. Algunos metabolitos y hormonas metabólicas, además de ser “salidas” del sistema circadiano, es decir, presentar ritmicidad circadiana, también pueden actuar como “entradas” al mismo (Méndez-Hernández et al., 2020). La testosterona, además de su rol reproductivo, es considerada una hormona metabólica. Los cambios en la secreción de testosterona podrían modular los ritmos circadianos de la temperatura corporal y de la conducta de los machos, pero de acuerdo a nuestro conocimiento, esto no ha sido estudiado hasta ahora.

3. HIPOTESIS

La aplicación de eCG a los carneros durante la primavera incrementa la concentración de testosterona y, en consecuencia, modifica el ritmo circadiano de la temperatura superficial del ojo y de la conducta en los carneros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la aplicación de eCG en el ritmo circadiano del comportamiento y la temperatura superficial de carneros Corriedale estabulados durante la primavera.

4.2 Objetivos específicos

Comparar el ritmo circadiano de:

1. el tiempo dedicado a efectuar las actividades: comiendo, rumiando, parado, echado, durmiendo
2. la temperatura superficial determinada a nivel de la pupila y ojo completo mediante el uso de cámara infrarroja,

en carneros Corriedale tratados o no con eCG durante la primavera.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de estudio, animales y manejo

Todos los procedimientos experimentales efectuados en el presente trabajo fueron aprobados por la Comisión de Ética en Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria (CEUA-FVET-931, Exp. 111900-000705-19). El experimento se realizó en la Facultad de Veterinaria durante la estación no reproductiva (entre agosto y setiembre). Se utilizaron 20 carneros adultos de la raza Corriedale, manejados en condiciones de estabulación. Los carneros fueron sometidos a un proceso de acostumbramiento de 21 d al alojamiento diurno en corrales individuales y a la presencia humana para reducir la influencia del estrés, requisito necesario para el tipo de experimento que se planteó. Todos los carneros fueron identificados con numeración del 1 al 20. Los carneros pernoctaron en corrales colectivos y de día en corrales individuales donde fueron cepillados durante 5 min diariamente. La alimentación fue a base de fardos de alfalfa y ración (de acuerdo al peso promedio de los animales), suministrado en cantidades iguales en dos momentos del día, 07:30-08:00 h y 15:30-16:00 h, con libre acceso a agua. El experimento tuvo una duración de 28 d, incluida la fase de acostumbramiento y dos muestreos de 26 h continuas, realizados con una semana de diferencia.

5.2 Variables ambientales

Durante los dos días de muestreo, se midió con un termohigrómetro digital portátil, colocado a la altura de los animales, la temperatura y humedad ambiente relativa cada hora. Como se puede observar en la Figura 3, la temperatura ambiental varió durante el día: las mayores temperaturas se presentaron en horas cercanas al mediodía y las menores durante la fase de oscuridad. Respecto a la humedad relativa, las horas de la madrugada presentaron la máxima humedad. Durante las horas diurnas, la humedad relativa del primer día de muestreo fue menor que durante el segundo muestreo. El fotoperiodo durante la fase experimental fue ~ de 11:30 h. En el primer y segundo muestreo el amanecer ocurrió a las 07:04 h y 06:56 h y el atardecer a las 18:25 h y 18:29 h, respectivamente.

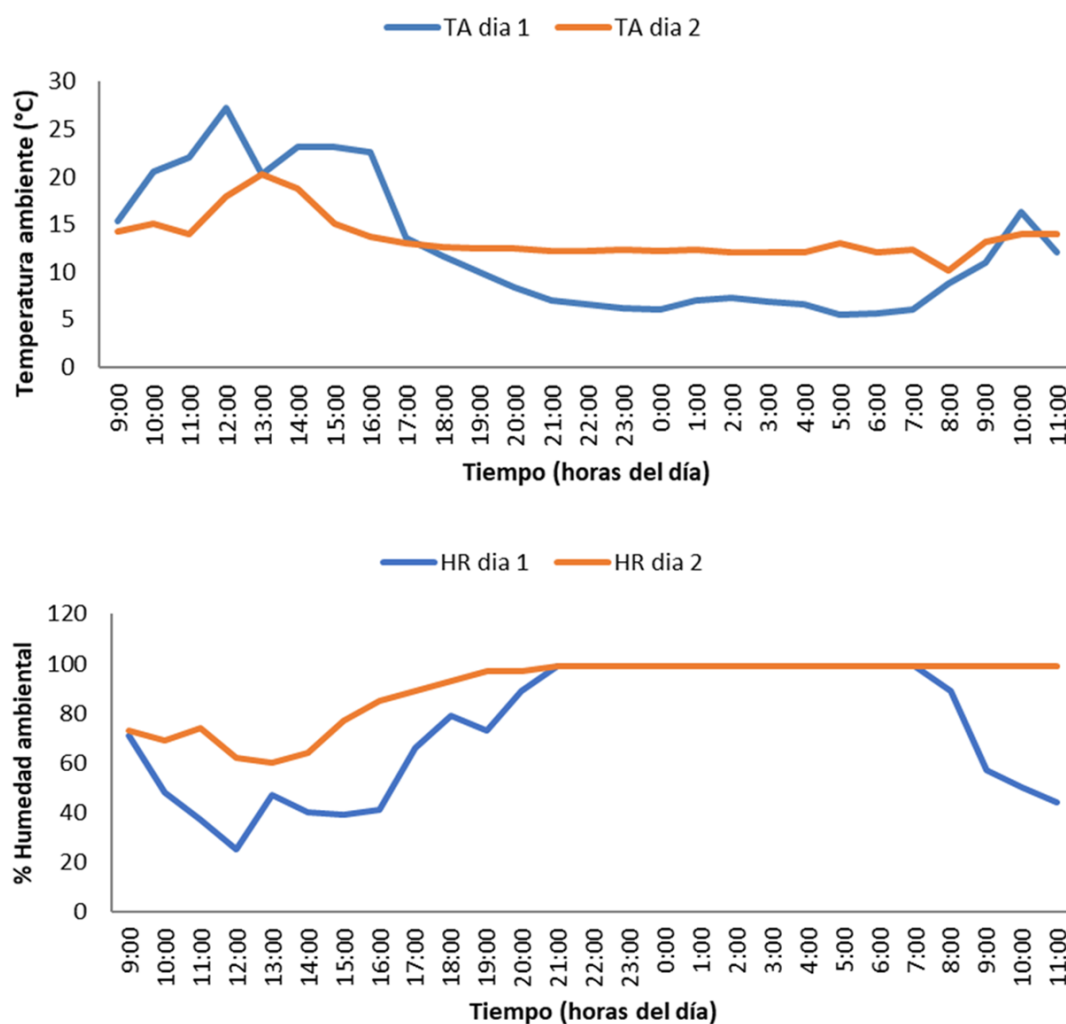


Figura 3. (Arriba) variación de la temperatura ambiente durante el primer (día 1) y segundo muestreo (día 2). (Abajo) variación de la humedad relativa durante el primer (día 1) y segundo muestreo (día 2).

5.3 Tratamientos y diseño del experimento

Se utilizó un diseño completamente al azar, adjudicando los carneros a uno de dos tratamientos: (1) Aplicación de eCG (CeCG): el día anterior a cada uno de los muestreos (~24 h) se le administró vía intramuscular 1000 UI de eCG; (2): Sin aplicación de eCG (CON): estos animales se manejaron en las mismas condiciones que los tratados, con la única diferencia que no se les aplicó la eCG.

Como fue mencionado arriba, se hicieron dos muestreos en dos días diferentes. En cada uno se muestrearon 10 carneros, 5 del CeCG y 5 del CON y en el segundo muestreo a los 10 carneros restantes. El horario para la toma de muestras de cada muestreo fue desde las 09:00 h del primer día hasta las 11:00 h del día siguiente, totalizando 26 h continuas, con intervalo de una hora entre cada medición de las variables evaluadas. Todos los animales fueron expuestos al fotoperiodo, temperatura ambiente y humedad relativa natural.

5.4 Variables evaluadas

Concentración de testosterona: las muestras de sangre para la determinación de testosterona fueron tomadas a través de un catéter colocado en la vena yugular, en intervalos de una hora, durante todo el experimento, es decir en ambos días de muestreo. La sangre se tomó en tubos sin aditivos, se centrifugó tan pronto como fue posible (a 1500g por 20 min) para separar el suero, el cual fue almacenado a -20 °C. Las concentraciones de testosterona se midieron por duplicado utilizando un kit de fase sólida de radioinmunoensayo comercial (TESTO-CT2 y CORT-CT2; Cisbio Bioassays, Francia). La concentración de testosterona se midió en doce muestras / animal: 09:00, 10:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00; 22:00; 24:00, 03:00, 06:00; 09:00 y 11:00 h. El límite de detección del ensayo fue de 0,16 nmol / L, y los coeficientes de variación intraensayo fueron del 14,8%, 11,7% y 7,6% para los controles de calidad bajo, medio y alto, respectivamente. Los coeficientes de variación interensayo estaban todos por debajo del 20%.

Actividades efectuadas por los carneros: las actividades efectuadas por los 10 carneros de cada muestreo fueron registradas cada hora por una persona entrenada. Las observaciones fueron efectuadas a través de paneo visual, tomándose unos segundos para determinar la actividad, desde un lugar alejado para no influir en la conducta de los mismos. En cada paneo se anotó si los carneros realizaban las siguientes actividades: comiendo, rumiando, parado, echado, durmiendo. Posteriormente, los datos fueron agrupados en los siguientes intervalos de tiempo: 09:00 a 12:00 h; 13:00 a 16:00 h; 17:00 a 20:00 h; 21:00 a 24:00 h; 01:00 a 04:00 h; 05:00 a 08:00 h; 09:00 a 11:00 h. Los resultados se expresan como porcentaje del tiempo en que cada carnero fue observado realizando la actividad en cada intervalo.

Temperatura del ojo: los registros termográficos fueron tomados utilizando una cámara FLIR modelo E95 (Flir, Estonia), la cual fue calibrada con los datos de temperatura ambiente, humedad relativa y temperatura reflejada registrados en cada medición. La temperatura reflejada se determinó como la temperatura captada por la propia cámara de una superficie corrugada de papel de aluminio. Las fotos se tomaron a una distancia de ~1 m de cada carnero. Las imágenes fueron procesadas con el software FLIR Tools. Se determinó la temperatura del centro del ojo (usando la herramienta de medición de un punto) y, la temperatura de la pupila y ojo completo (usando la herramienta elipse) para todas las mediciones.

5.5 Análisis estadístico

Todas las variables fueron analizadas con un modelo mixto (proc mixed; SAS, University Edition). El modelo incluyó el tratamiento (CON vs CeCG), el tiempo de medición como variable repetida y su interacción como efectos fijos. El día de muestreo se utilizó como efecto aleatorio. La mejor estructura de varianza-covarianza fue seleccionada de acuerdo con Littell et al. (1998). La estimación y comparación de las medias se realizó con las instrucciones PDIF de SAS.

Para determinar las características del ritmo circadiano se ajustaron los datos a una función cosenoidal mediante el uso del programa Cosinor.exe. Las características determinadas fueron: mesor (el valor medio del ritmo), la amplitud (diferencia entre el mesor y el máximo o el valor mínimo) y acrofase (localización temporal del valor máximo) y robustez (fuerza del ritmo, lo que se traduce como lo certero de esos datos). Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $P < 0,05$, y como tendencias aquellas en que $0,05 < P < 0,1$.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración de testosterona

La concentración de testosterona en todos los tiempos de medición fue superior en los carneros CeCG que en los CON ($32,7 \pm 0,7$ nmol/L vs $5,8 \pm 0,7$ nmol/L; $P < 0,0001$). No hubo efecto del tiempo ni interacción entre tratamiento y tiempo en esta variable.

6.2 Actividades efectuadas por los carneros

En el Cuadro 1 se observan las medias estimadas y probabilidad de los efectos principales evaluados, del porcentaje del tiempo que los carneros dedicaron a efectuar las actividades registradas. Ninguna de las actividades registradas fue afectada por el tratamiento o la interacción tratamiento x tiempo. Sin embargo, el tiempo dedicado a cada actividad varió de acuerdo al periodo del día ($P < 0,0001$) para todas las actividades, con excepción de la actividad durmiendo cuyo efecto del tiempo fue solo una tendencia ($P = 0,10$). Las características del ritmo circadiano para estas variables se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Medias estimadas $\pm$ EE (error estándar) y principales efectos de la aplicación de eCG (CeCG) o no (CON), intervalo del día (tiempo) y la interacción tratamiento x tiempo, sobre el porcentaje del tiempo que los carneros dedican a efectuar las actividades registradas.

Variable	Tratamiento			P-valor		
	CeCG	CON	EE	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo
Comiendo	24,5	26,2	1,9	ns	<0,0001	ns
Rumiando	26,3	24,6	2,4	ns	<0,0001	ns
Parados	39,7	39,6	2,2	ns	<0,0001	ns
Echados	57,7	59,3	5,1	ns	<0,0001	ns
Durmiendo	4,7	8,2	2,1	ns	0,1	ns

ns: no significativo, $P > 0,05$).

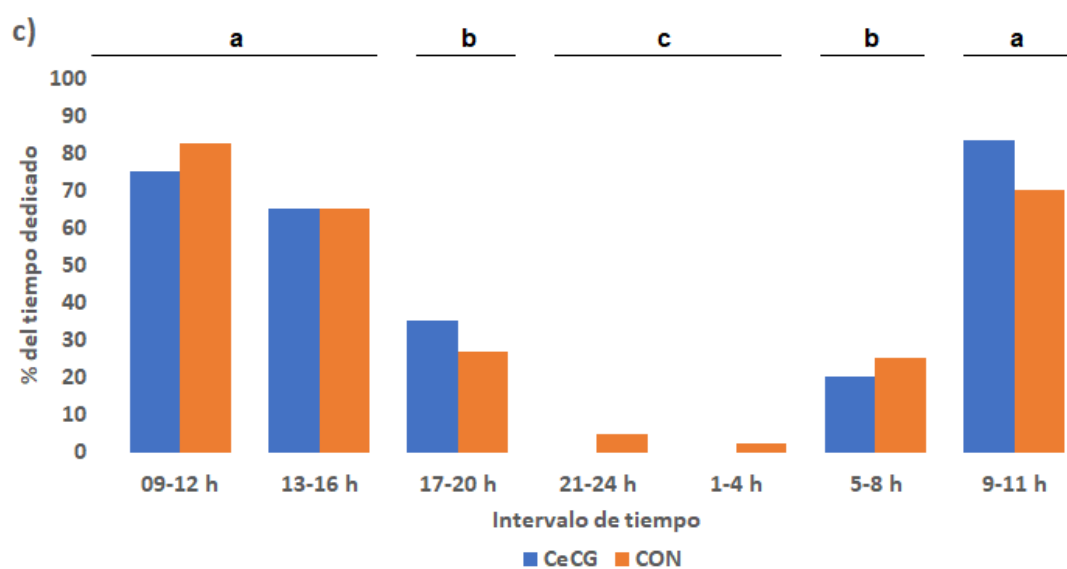
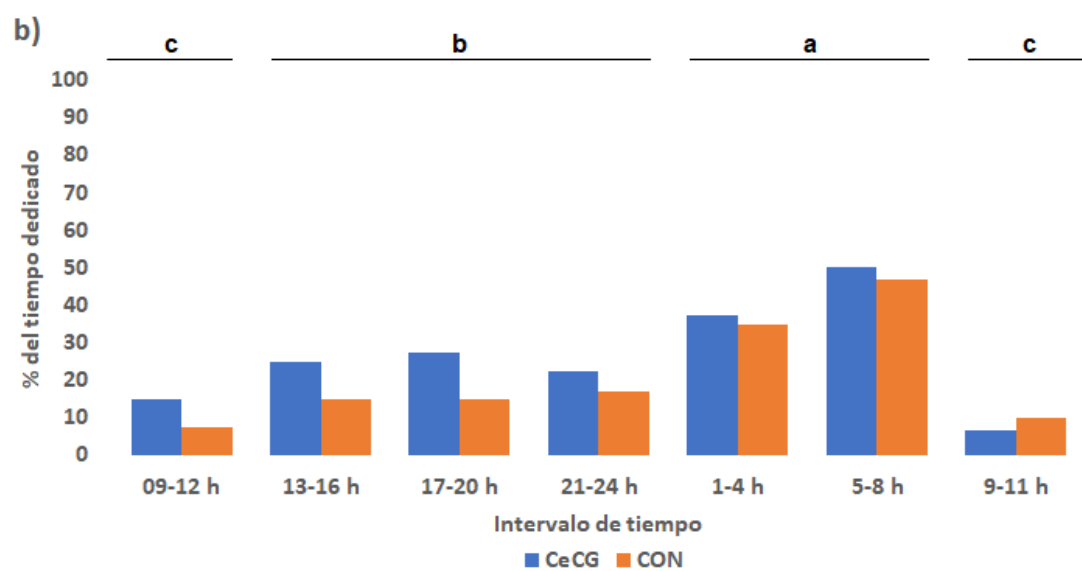
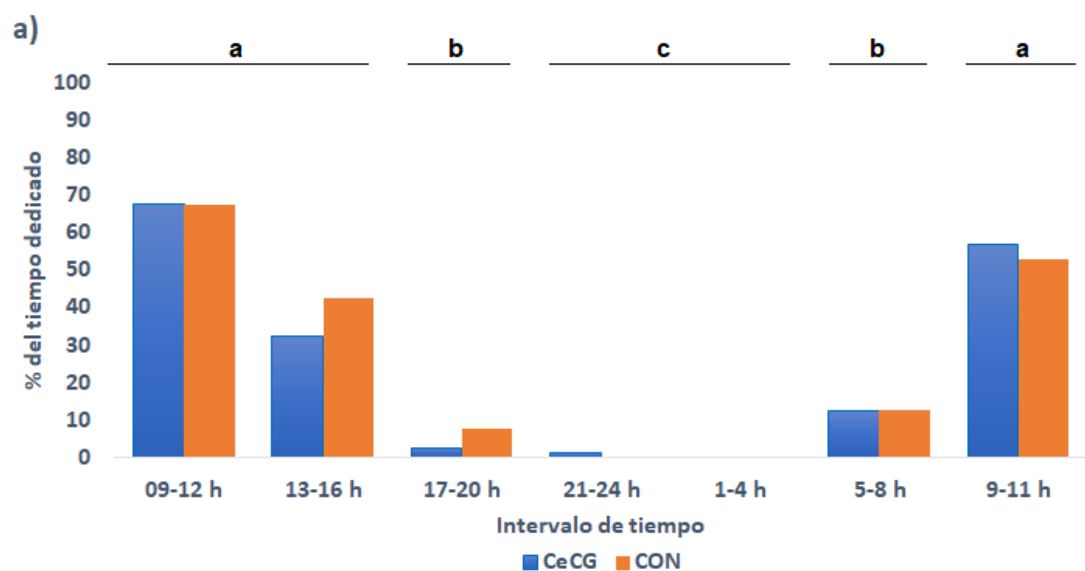
El mayor tiempo dedicado al consumo de alimentos se presentó en horas de la mañana en ambos tratamientos (entre las 09:00 y las 12:00 h) ($P < 0,0001$; Figura 4a). Sin embargo, el pico de consumo (acrofase) ocurrió más temprano en el tratamiento CeCG (Cuadro 2; $P < 0,05$). El tiempo dedicado a la rumia fue mayor al final de la fase oscura y antes del suministro de alimentos de la mañana (entre la 01:00 y 08:00 h) ($P < 0,0001$; Figura 4b). La robustez del ritmo para el tiempo dedicado a la rumia fue superior en el CON ($P = 0,08$); en ambos tratamientos la acrofase ocurrió ~ 6:30 h (Cuadro 2).

Cuadro 2. Medias estimadas $\pm$ EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano del tiempo dedicado a las actividades registradas en carneros a los que se les aplicó eCG (CeCG) o no (CON).

Variable	Tratamiento	Mesor	Amplitud	Acrofase	Robustez
Comiendo	CeCG	$19,9 \pm 1,1$	$32,1 \pm 6,2$	$09:48 \pm 00:16^a$	$76,7 \pm 5,4$

Rumiando	CON	21,6 ± 1,1	32,6 ± 6.2	10:20 ± 00:16 ^b	72,6 ± 5.4
	CeCG	27,4 ± 2,9	17,4 ± 2.8	07:30 ± 04:57	31,8 ± 6.4
	CON	26,6 ± 2,9	21,8 ± 2.8	05:25 ± 04:57	47,4 ± 6.4†
Parado	CeCG	33,9 ± 2,1	44,5 ± 4.8	11:19 ± 00:28	86,4 ± 2.9 ^a
	CON	34,1 ± 2,1	41,1 ± 4.8	10:57 ± 00:28	78,1 ± 2.9 ^b
Echado	CeCG	63,2 ± 2,9	42,2 ± 2.7	20:32 ± 01:33	82,9 ± 3.8 ^a
	CON	64,4 ± 2,9	37,3 ± 2.7	22:35 ± 01:33	71,4 ± 3.8 ^b
Durmiendo	CeCG	5,2 ± 2,1 ^b	9,6 ± 2.3	21:39 ± 00:57 ^b	45,8 ± 8.6
	CON	9,1 ± 2,3 ^a	12,4 ± 2.6	02:02 ± 01:06 ^a	53,8 ± 12.2

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$); † tendencia ($P < 0,10$).



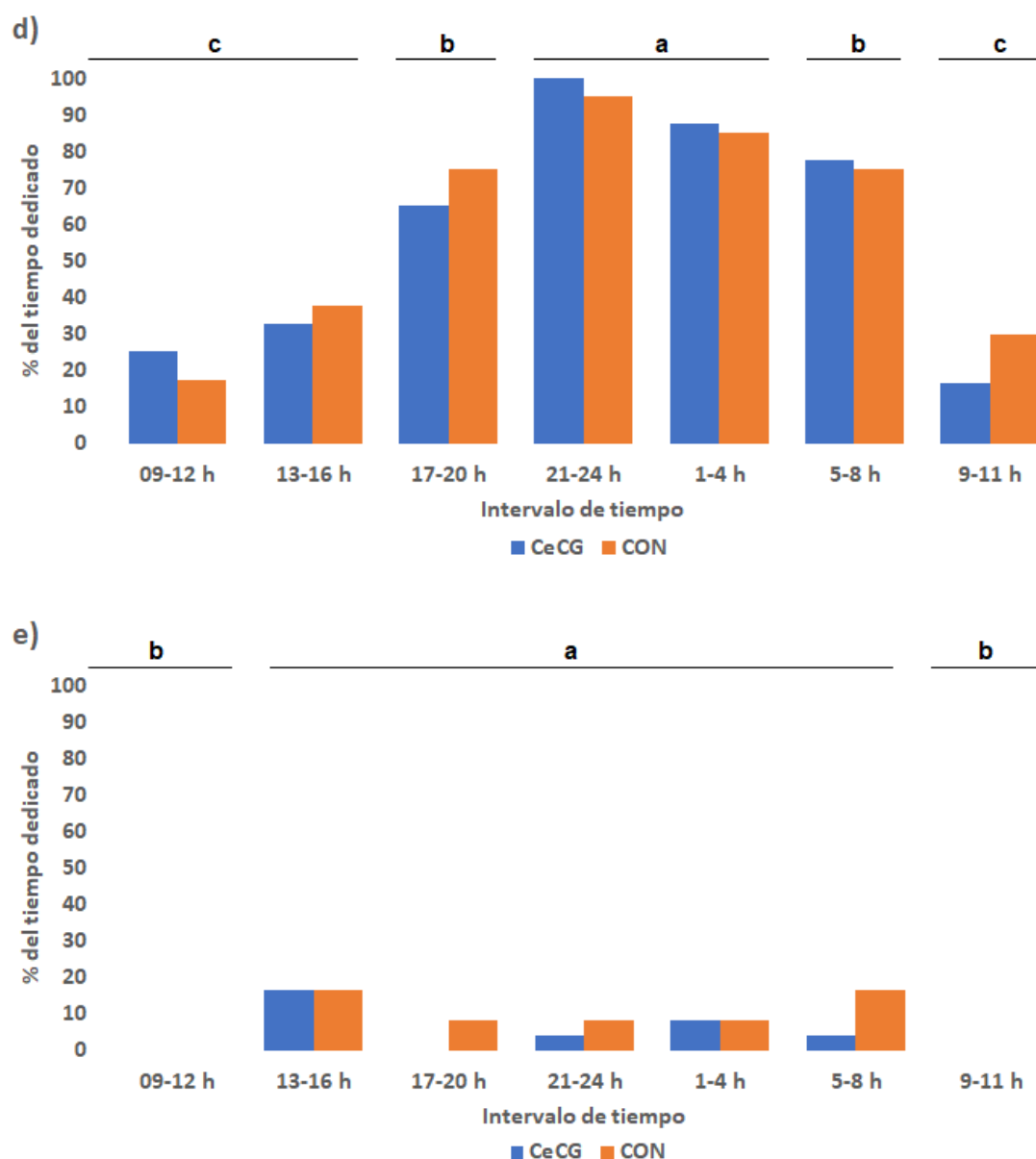


Figura 4. a) Porcentaje del tiempo dedicado a la actividad comiendo (a), rumiando (b), a la actividad parado (c) a la actividad echados (d) y a la actividad durmiendo (e) en varios periodos del día en carneros a los que se les aplicó eCG (CeCG) o no (CON). Letras diferentes implican diferencias entre periodos ($P < 0,0001$).

El mayor porcentaje de tiempo dedicado a estar parados se presentó entre las 09:00 y 16:00 h ($P < 0,0001$; Figura 4c). La acrofase para esta actividad se presentó ~ 11:00 h, sin diferencias entre tratamientos. Sin embargo, se observó que la robustez del ritmo fue superior en CeCG que en el CON ($P < 0,05$; Cuadro 2). Los carneros dedicaron tiempo a estar echados en todos los intervalos registrados, pero el tiempo dedicado a esta actividad fue mayor durante las horas nocturnas (entre las 21:00 y las 04:00 h) ($P < 0,0001$; Figura 4d), siendo la acrofase en ambos grupos ~ 21:30 h (Cuadro 2). La robustez del ritmo para el tiempo dedicado a estar echados fue alta y además fue superior en el CeCG ($P < 0,05$; Cuadro 2). El tiempo dedicado a dormir fue bajo ($< 10\%$; Cuadro 1); no obstante, los carneros del tratamiento CeCG duermen menos y lo hacen más temprano que el CON ($P < 0,05$; Cuadro 2).

6.3 Temperatura del ojo

En el Cuadro 3 se presentan las medias de las temperaturas en el centro del ojo (usando la herramienta de medición de punto), pupila (usando la herramienta de elipse) y ojo completo (usando la herramienta de elipse). Las temperaturas registradas fueron inferiores en CeCG que en CON ($P < 0,05$). Además, la temperatura varió de acuerdo al momento del día ($P < 0,0001$), siendo mayor en la mañana y mediodía, para disminuir en la tarde y noche (Figura 5). Ninguna de las temperaturas registradas fue afectada por la interacción entre tratamiento y tiempo.

Cuadro 3. Medias estimadas, EE (error estándar) y principales efectos de la aplicación de eCG (CeCG) o no (CON) en la temperatura del centro del ojo, pupila y ojo entero de los carneros.

Variable (°C)	Tratamiento		EE	P-valor			x
	CeCG	CON		Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo	
Centro	31,5	32,2	0,7	0,02	<0,0001	ns	
Pupila	31,4	32,1	0,4	0,05	<0,0001	ns	
Ojo	30,8	31,7	0,2	0,004	<0,0001	ns	

ns: no significativo, $P > 0,05$).

Respecto a las características del ritmo, no se presentaron diferencias entre tratamientos en ninguna de ellas (Cuadro 4). La robustez del ritmo de las temperaturas registradas a nivel del ojo fue de media a baja y solo se presentó una tendencia de una robustez superior en el CON cuando la temperatura fue tomada en el centro del ojo; la acrofase en todos los casos ocurrió entre las 09:30 y 12:30 h del día.

Cuadro 4. Medias estimadas $\pm$ EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano de la temperatura del ojo en carneros con aplicación de eCG (CeCG) o no (CON).

Variable	Tratamiento	Mesor	Amplitud	Acrofase	Robustez
Centro	CeCG	31,3 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,3	12:30 $\pm$ 01:18	16,1 $\pm$ 3,1
	CON	31,9 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,3	11:00 $\pm$ 01:24	23,2 $\pm$ 3,1†
Pupila	CeCG	31,3 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,3	09:48 $\pm$ 01:00	18,4 $\pm$ 4,1
	CON	32,0 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,3	09:36 $\pm$ 01:00	18,6 $\pm$ 4,1
Ojo	CeCG	30,5 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,3	10:18 $\pm$ 00:42	24,7 $\pm$ 4,4
	CON	31,5 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,3	10:48 $\pm$ 00:42	22,8 $\pm$ 4,4

† tendencia ($P < 0,10$)

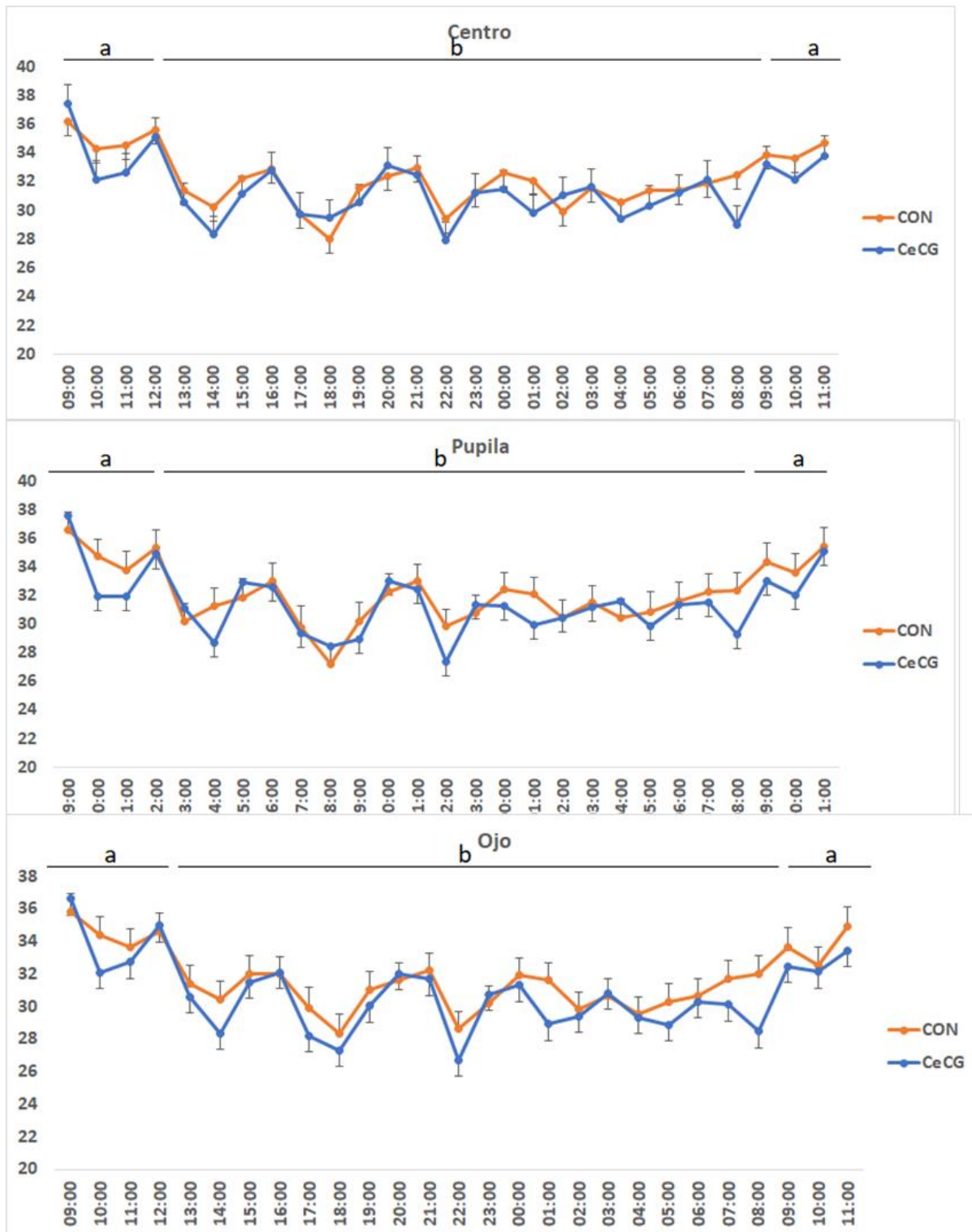


Figura 5. (De arriba a abajo) variación de la temperatura central, de la pupila y ojo a lo largo del experimento, comparando los carneros que fueron dosificados con eCG y el grupo CON.

7. DISCUSIÓN

Los resultados presentados demuestran que la aplicación de eCG modificó el ciclo de actividad y reposo de los carneros. El adelanto en la acrofase de las actividades comer y dormir, la sincronía entre la acrofase de dormir y estar echados, así como la menor proporción de tiempo dedicada a esta última actividad en los carneros CeCG pueden relacionarse con la promoción de estados de alerta- vigilia promovidos por la mayor secreción de testosterona en este grupo. Estudios en humanos reportaron que niveles altos de testosterona pueden acortar el tiempo dedicado a dormir (Leibenluft et al., 1997) ya que esta puede alterar directamente el sueño a través de efectos en el sistema nervioso central (Fink, Sumner, Rosie, Wilson & McQueen, 1999). En general, los ovinos no presentan un sueño profundo, ya que naturalmente son presas de otros animales (en el hábitat salvaje) y se mantienen en un estado de vigilia la mayor parte del tiempo, y a su vez las constantes contracciones ruminales lo mantienen despierto para realizar la digestión (Cunningham & Acker, 1998). El aumento de testosterona causó el adelanto en la ingesta, en la pernoctación y un menor tiempo dedicado al descanso. No hay estudios sobre la relación entre el horario dedicado a comer y los niveles de testosterona, pero basándonos en los resultados obtenidos, se puede interpretar que existe un mayor estado de alerta en los animales con altos niveles de testosterona, y por lo tanto, se alimentan antes posiblemente por instinto de supervivencia, para permanecer en estado de alerta y/o adelantarse a otras actividades como las sexuales.

La administración de eCG redujo la temperatura superficial del ojo, lo que indicaría que la testosterona pudiera estar implicada en la regulación homeostática de la temperatura de los machos. La testosterona presenta efectos vasodilatadores, incluida la vasodilatación periférica (Jones et al., 2003), lo que pudo haber causado un aumento del flujo sanguíneo cutáneo y promovido la pérdida de calor por convección (Somerén, 2011). Sin embargo, dado que el experimento se efectuó al finalizar el invierno, no es claro si la homeostasis de la temperatura superficial puede relacionarse exclusivamente con mecanismos de termólisis. Otra posible explicación, no contrapuesta, podría estar relacionada con los efectos cardiovasculares de la testosterona, que genera un cambio en la distribución sanguínea hacia los órganos internos, para evitar la pérdida de calor, pero lamentablemente no se registró la temperatura rectal de los carneros para corroborar esta explicación.

Como fue descrito previamente, los carneros recibieron dos comidas (am y pm) durante el día. Sin embargo, el mayor tiempo dedicado a comer se presentó en las mañanas por lo que, probablemente, la velocidad de consumo de la comida de la tarde fue mayor. En ambos grupos, el mayor tiempo dedicado a estar parados ocurrió durante el día, lo que confirma el hábito diurno de los ovinos, tal como ha sido previamente reportado (Piccione et al., 2008). La acrofase del tiempo dedicado a estar parados ocurrió al final de la mañana, posterior a la acrofase de comiendo, por lo que, estar parados pudiera relacionarse con el hecho de dedicar más tiempo a consumir alimentos durante la primera fase del día. La actividad de rumia presentó la más baja robustez de todas las variables de conducta evaluadas. Los carneros dedican varios momentos del día a rumiar, sin embargo, la acrofase para el tiempo dedicado a esta actividad se presenta al final del periodo de oscuridad. No hubo modificación en el ritmo de la rumia, y en ambos grupos se correlaciona con lo expuesto por Gordon & McAllister (1970), donde luego de la ingesta la rumia es muy baja y en los horarios nocturnos presentan una mayor rumia.

Respecto a la ritmicidad de la temperatura superficial, ninguna de las variables de la ritmicidad fue afectada por la aplicación de eCG, por lo que aunque la concentración de testosterona afecta la homeostasis de la temperatura superficial, no parece influir en su regulación circadiana. Posiblemente la regulación de la temperatura superficial tiene mayor influencia externa, es decir de la temperatura ambiente. La robustez del ritmo circadiano de la temperatura fue de medio a bajo. La acrofase en ambos grupos se presentó entre las 10:00h y las 12:00h, difiriendo de los resultados presentados por Pinto-Santini & Ungerfeld (2019) en ovejas en la región tropical, quienes reportan que la acrofase de la temperatura son más tardías, al final de la tarde. Si bien la acrofase ocurrió

en el rango horario presentado por Refinetti y Piccione (2003), entre las 09:00h y 16:00h, la temperatura comenzó a disminuir desde el mediodía, siguiendo un patrón similar al de la temperatura ambiente, lo que pudiera indicar que, a pesar que se ha reportado una correlación entre la temperatura del ojo y la temperatura rectal (George et al., 2014), la regulación de la temperatura del ojo no necesariamente este bajo control del sistema circadiano, cosa que si ha sido corroborada en la temperatura rectal (Piccione, 2020).

8. CONCLUSIONES

La administración de eCG determinó un incremento en los niveles de testosterona, pero no modificó el ritmo circadiano de la temperatura en carneros, aunque provocó una disminución de la misma. Además, modificó la ritmicidad circadiana del tiempo dedicado al consumo de alimento (fase de actividad) y a dormir (fase de reposo).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Fazio, F., & Piccione, G. (2016). Age related changes of serum mitochondrial uncoupling 1, rumen and rectal temperature in goats. *Journal of Thermal Biology*, 59, 47–51.
- Arnold, G. (1962) The influence of several factors in determining the grazing behavior of Border Leicester x Merino sheep. *Grass and Forage*, 17(1), 41–51.
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man: A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science*, 148(3676), 1427–1432.
- Aschoff, J. & Heiss, A. (1972). Advances in Climatic Physiology. Tokyo: Igaku Shoin. Thermal Conductance in Man: its Dependence on Time of Day and on Ambient Temperature. *Advances in Climatic Physiology*, 1334–1364.
- Battersby, I.A., Murphy, K.F., Tasker, S., & Papsouliotis, K. (2006). Retrospective study of fever in dogs: laboratory testing, diagnoses and influence of prior treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 47, 370–376.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295, 1070-3.
- Cunningham, M., & Acker, D. (1998). Animal behavior. En *Animal Science and Industry* (pp. 79-90). Nueva Jersey: Prentice Hall.
- Edgar, J. L., Lowe, J. C., Paul, E. S., & Nicol, C. J. (2011). Avian maternal response to chick distress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1721), 3129-3134.
- Fernández Carmona, J., Blas Ferrer, E., Cervera Fras, C., Fernández Martínez, C., Jóver Cerdá, M., & Pascual Amorós, J. (2017). *Datos sobre conducta y bienestar de animales en granja departamento de ciencia animal*. Valencia: Universitat politècnica València.
- Fink, G., Sumner, B., Rosie, R., Wilson, H., & McQueen, J. (1999). Androgen actions on central serotonin neurotransmission: relevance for mood, mental state and memory. *Behavioural Brain Research*, 105, 53–68.
- Fraser, A.F. (1980). Farm animal behavior and welfare. Ethology welfare and preventive medicine for livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 16
- Garaulet, M., & Madrid, J.A. (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*, 20, 127-34.
- George, W. D., Godfrey, R. W., Ketring, R. C., Vinson, M. C., & Willard, S. T. (2014). Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, 92(11), 4949-4955.
- Gerpe, A. I. (2014). *Ritmos de actividad-inactividad de la oveja mallorquina* (Memoria de grado). Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca.

- Giannetto, C., Arfuso, F., Giudice, E., Giancesella, M., Fazio, F., Panzera, M., & Piccione, G. (2020). Infrared methodologies for the assessment of skin temperature daily rhythm in two domestic mammalian species. *Journal of Thermal Biology*, 92, 102677.
- Golombek D. (2007). Introducción. La Máquina del Tiempo. En *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (2ª ed., pp. 19-35). Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmas.
- Gordon, J. G., & McAllister, I. K. (1970). The circadian rhythm of rumination. *Journal of Agricultural Science*, 74(02), 291.
- Hafez, E.S.E. & Habez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ª ed). México: Mcgraw Hill.
- Hastings, M. (1997). Circadian clocks. *Current Biology*, 7 (10), 670-672.
- Johnson, S., Rao, S., Hussey, S., & Morley, P. (2011). Thermographic Eye Temperature as an Index to Body Temperature in Ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*, (31), 63-66.
- Jones, R. D., Pugh, P. J., Jones, T. H., & Channer, K. S. (2003). The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *British Journal of Pharmacology*, 138 (5), 733–744.
- Katsoulos, P.D., Athanasiou, L.V., Karatzia, M.A., Valasi, I., Boscós, C., & Karatzias, H., (2016). Comparison of a non-contact infrared thermometer with a rectal digital thermometer for use in ewes. *Small Ruminant Research*, 143, 84–88.
- Kieltyka-Kurc, A., Rydel-Gigauri, J., & Gorecki, M. (2013). Circadian activity of dairy ewes kept indoors. *Annals of Animal Science*, 13(1), 55-62
- Leibluft, E., Schmidt, P.J., Turner, E.H., Danaceau, M.A., Ashman, S.B., Wehr, T.A., & Rubinow, D.R. (1997). Effects of leuprolide-induced hypogonadism and testosterone replacement on sleep, melatonin, and prolactin secretion in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 3203–3207.
- Maloney, S. K & Blache, D. (2017). New physiological measures of the biological cost of responding to challenges. En D.M. Ferguson, C. Lee & A. Fisher (Eds.), *Advances in Sheep Welfare* (pp. 73-104). Sawston: Woodhead Publishing
- Malpaux, B., Robinson, J. E., Brown, M. B., & Karsch, F. J. (1988). Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the Suffolk ewe. *Reproduction*, 83 (1), 461–470.
- McCafferty, D. J. (2007). The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. *Mammal Review*, 37 (3), 207–223.
- 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, 1-7.
- Mendez-Hernandez, R., Escobar, C., & Ruud, M. (2020). Suprachiasmatic Nucleus–Arcuate Nucleus Axis: Interaction Between Time and Metabolism Essential for Health. *Obesity*, 28(S1); 1-8

- Mendoza, J. (2009). Neurobiología del sistema circadiano: su encuentro con el metabolismo. *Suma Psicológica*, 16 (1), 85-95.
- Morgan, K., (1997). Effects of short-term changes in ambient air temperature or altered insulation in horses. *Journal of Thermal Biology*, 22, 187–194.
- Murphy, B.D., & Martinuk, S.D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12, 27–44.
- Narayan, E., Perakis, A., & Meikle, W. (2019). Using Thermal Imaging to Monitor Body Temperature of Koalas (*Phascolarctos cinereus*) in A Zoo Setting. *Animals*, 9 (12), 1094.
- Pérez-Clariget, R., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H. (1998). Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxin in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39: 35–47.
- Piccione, G., & Refinetti, R. (2003). Thermal chronobiology of domestic animals. *Frontiers in Bioscience*, 8 (6), 258–264
- Piccione, G., Caola, G., & Mortola, J. (2005). Scaling the daily oscillations of breathing frequency and skin temperature in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140 (4), 477–486.
- Piccione, G., Giannetto, C., Casella, S., & Caola, G. (2008). Circadian Activity Rhythm in Sheep and Goats Housed in Stable Conditions. *Folia Biologica*, 56 (3), 133–137.
- Piccione, G., Giannetto, C., Caola, G., & Casella, S. (2010). Daily locomotor activity in five domestic animals. *Animal Biology*, 60 (1), 15–24.
- Piccione, G. (2020). Infrared methodologies for the assessment of skin temperature daily rhythm in two domestic mammalian species. *Journal of Thermal Biology*, 92, 1-7.
- Pinto-Santini, L., & Ungerfeld, R. (2019). The phase of the estrous cycle modifies the endocrine, metabolic and behavior rhythms in ewes. *Physiology & Behavior*, 15, 324-335.
- Refinetti, R. (2016). *Circadian physiology* (3^a ed.). Boca Ratón: CRC.
- Refinetti, R. (2020). Circadian rhythmicity of body temperature and metabolism. *Temperature*, 7(4), 321-362
- Roenneberg, T., & Merrow, M. (1998). Molecular Circadian Oscillators: An Alternative Hypothesis. *Journal of Biological Rhythms*, 13(2), 167-179.
- Sabater Gárriz, A. (2019). *Parámetros circadianos del ritmo sueño vigilia en adultos con parálisis cerebral y su relación con los hábitos de vida: estudio piloto* (Memoria de maestría). Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca.
- Sykes, D. J., Couvillion, J. S., Cromiak, A., Bowers, S., Schenck, E., Crenshaw, M., & Ryan, P. L. (2012). The use of digital infrared thermal imaging to detect estrus in gilts. *Theriogenology*, 78, 147-152.
- Someren, V. (2011). *Handbook of the Biology of Aging* (7^a ed.). Cambridge: Academic Press.
- Ternman, E. (2014). *Sleep in Dairy Cows* (Tesis doctoral). Faculty of Veterinary, Uppsala.

- Ungerfeld, R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaaf rams. *Animal Production Science*, 52 (11), 1036-1041.
- Ungerfeld, R., & Lacuesta, L. (2015). Competition between different social ranked rams has similar effects on testosterone and sexual behavior throughout the year. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 1022–1027.
- Ungerfeld, R., Clemente, N., & Orihuela, A. (2018). Treatments with eCG and courtship behaviour in rams during the breeding and the non-breeding seasons. *Animal Production*, 59(5), 865-869.
- Webb, I.C., Antle, M.C., & Mistlberger, R.E. (2014). Regulation of circadian rhythms in mammals by behavioral arousal. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 304–325.