

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE LA ÉPOCA DEL AÑO SOBRE EL RITMO CIRCADIANO DE LA
CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA Y LA TEMPERATURA SUPERFICIAL EN
CARNEROS CORRIEDALE**

Por

**LEANDRO MÉNDEZ
JOAQUÍN RODRÍGUEZ**

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

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2022

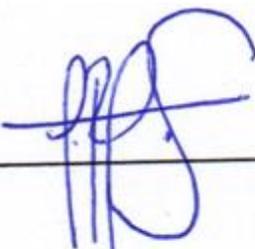
PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: Isabel Vázquez



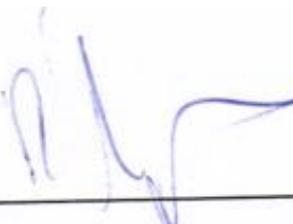
Segundo miembro (Tutor):



Tercer miembro:



Cuarto miembro:



Fecha:

23/05/22.

Autores:



AGRADECIMIENTOS

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

A Milton, por su colaboración en el manejo de los animales.

A nuestras familias por ser un pilar fundamental desde el inicio de la carrera universitaria, hasta el día de hoy, brindándonos su total confianza y apoyo.

A nuestros amigos de siempre y a todos nuestros compañeros de esta carrera y en especial a aquellos que han sabido convertirse en amigos muy queridos.

Tabla de contenido	
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Cronobiología. Ritmos biológicos: importancia y componentes básicos	10
2.2 Características de los ritmos biológicos.....	11
2.3 Diferencias estacionales y variación diaria en la concentración de testosterona en carneros	12
2.4 Testosterona: Rol metabólico y termorregulatorio	13
2.5 Ritmicidad de la temperatura corporal y algunos factores que la afectan	14
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1 Lugar de estudio, animales y manejo	18
5.2 Tratamientos	18
5.3 Variables ambientales	18
5.4 Variables evaluadas	19
5.5 Concentración de testosterona	19
5.6 Temperatura superficial tomada a nivel del ojo, nariz y hocico	19
5.7 Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	22
6.1 Concentración de testosterona	22
6.2 Temperatura superficial tomada a nivel del ojo, nariz y hocico	22
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	30
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Características del ritmo circadiano de la concentración de cortisol en humanos (Sabater Gárrix, 2019).	12
Figura 2. Temperatura ambiental y humedad relativa en los dos días de muestreo (agosto y febrero).	19
Figura 3. Imágenes que ilustran las regiones anatómicas en la que se hicieron las determinaciones de la temperatura: ojo, fosa lagrimal externa proximal y distal, la base de la oreja y la nariz.	20
Cuadro 1. Medias estimadas \pm EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano de la concentración de testosterona en los carneros en diferentes momentos del año (agosto y febrero).	22
Cuadro 2. Medias estimadas \pm EE (error estándar) y principales efectos del momento del año (agosto y febrero), hora del día (tiempo) e interacción entre tratamiento y tiempo en la temperatura superficial determinada a nivel del ojo y región rostral en carneros.	23
Cuadro 3. Medias estimadas \pm EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano de la temperatura en diferentes puntos de la superficie rostral de los carneros.	23
Figura 4. Concentración de testosterona en función del tiempo (horas) en agosto y febrero.	24
Figura 5. Variación de la temperatura durante el día de las variables centro del ojo, pupila y ojo completo.	24
Figura 6. Variación de la temperatura durante el día de las variables fosa lagrimal proximal	26

RESUMEN

La ritmicidad circadiana de algunas funciones fisiológicas de los ovinos, una especie con reproducción estacional, podrían modificarse de acuerdo al momento del año. Con base en ello, el objetivo del experimento fue comparar el ritmo circadiano de la concentración de testosterona y de la temperatura superficial en dos momentos del año en carneros. Para ello, 10 carneros Corriedale, manejados a cielo abierto y alimentados con fardos de alfalfa y alimento concentrado comercial dos veces al día (AM: entre las 07:30 y las 08:30 h; PM: entre las 15:30 y las 16:30 h), fueron alojados en corrales individuales en los siguientes momentos: a) febrero (fotoperiodo decreciente, mayores temperaturas ambientales); b) agosto (fotoperiodo creciente, menores temperaturas ambientales). En cada momento del año, la temperatura superficial fue determinada cada hora, por 26 horas continuas, en diferentes zonas de la región rostral (ojo, fosas lagrimales externas, hocico y base de la oreja), utilizando una cámara infrarroja. Las muestras de sangre para la determinación de testosterona a través de radioinmunoanálisis fueron tomadas a las 9:00, 10:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 22:00, 00:00, 3:00, 6:00, 9:00, 11:00 h. Las características del ritmo (mesor, amplitud, acrofase y robustez), fueron determinadas por el programa Cosinor.exe, versión 3.1 desarrollada por Refinetti (2015) y el análisis estadístico se efectuó mediante modelo mixto (proc mixed: SAS, University Edition). El mesor (valor medio del ritmo), fue la única característica del patrón de variación diario de testosterona que fue afectado por el momento del año, siendo superior en febrero que en agosto ($13,1 \pm 0,8$ nmol/L vs $6,0 \pm 0,8$ nmol/L; $P < 0,05$). Respecto a la temperatura superficial, el mesor, tanto de la fosa lagrimal proximal como la distal, fue superior en febrero ($34,5 \pm 0,3$ °C y $33,8 \pm 0,4$ °C; $P < 0,05$) que en agosto ($32,5 \pm 0,3$ °C y $31,2 \pm 0,4$ °C; $P < 0,05$), respectivamente, lo cual pudo estar asociado con la mayor temperatura ambiental registrada en febrero. Se observó una menor amplitud ($0,6 \pm 0,1$ °C vs $1,6 \pm 0,1$ °C; $P < 0,05$) y una acrofase más tardía de la temperatura del ojo completo ($14:24 \pm 01:00$ h vs $09:54 \pm 01:00$ h; $P < 0,05$) en febrero que, en agosto, esta última asociada con la hora del día en que se presentan las mayores temperaturas ambientales durante el día. El patrón de variación diario de la concentración de testosterona es más estable que el de la temperatura superficial, la cual, al parecer es influida por la temperatura ambiental y, por los propios mecanismos homeostáticos requeridos para la mejor adaptación de los animales a las diferentes estaciones.

SUMMARY

The circadian rhythm of some physiological functions in sheep, a specie with seasonal reproduction, could be modified according to the season. Based on this, the objective of the experiment was to compare the circadian rhythms of testosterone concentration and surface temperature at two times of the year in rams. For this purpose, 10 Corriedale rams, managed outdoors and fed alfalfa hay and commercial concentrate feed twice a day (AM: between 07:30 and 08:30 h; PM: between 15:30 and 16:30 h), were housed in individual pens at the following times: a) February (decreasing photoperiod, high ambient temperatures); b) August (increasing photoperiod, low ambient temperatures). At each time of the year, the surface temperature was determined every hour, for 26 continuous hours, in different areas of the rostral region (eye, external tear troughs, muzzle, and base of the ear) using an infrared camera. Blood samples for testosterone determination through radioimmunoassay were taken at 9:00, 10:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 22:00, 00:00, 00:00, 3:00, 6:00, 9:00, 11:00 h. The Cosinor.exe program, version 3.1 developed by Refinetti (2015), was used to determine the characteristics of the rhythm (mesor, amplitude, acrophase, and robustness), and a mixed model (proc mixed: SAS, University Edition) was performed the statistical analysis too. The mesor (mean value of the rhythm) was the only characteristic of the daily variation pattern of testosterone that was affected by the time of the year, being higher in February than in August (13.1 ± 0.8 nmol/L vs. 6.0 ± 0.8 nmol/L; $P < 0.05$). Regarding surface temperature, the mesor, both proximal and distal lacrimal fossa, was higher in February (34.5 ± 0.3 °C and 33.8 ± 0.4 °C; $P < 0.05$) than in August (32.5 ± 0.3 °C and 31.2 ± 0.4 °C; $P < 0.05$), respectively, which could be associated with the higher ambient temperature recorded in February. A lower amplitude (0.6 ± 0.1 °C vs 1.6 ± 0.1 °C; $P < 0.05$) and later acrophase of full eye temperature ($14:24 \pm 1.0$ h vs. $09:54 \pm 1.0$ h; $P < 0.05$) were observed in February than in August, the latter probably associated with the time of day when the highest daytime ambient temperatures occur. The daily variation pattern of testosterone concentration is more stable than the surface temperature one. This latter probably was influenced by environmental temperature and by thermoregulatory mechanisms needed for the best adaptation of the animals to the different seasons.

1. INTRODUCCIÓN

La existencia de los ritmos biológicos es conocida desde la antigüedad. No obstante, la primera descripción sobre un proceso biológico rítmico fue realizada en el campo de la botánica durante el siglo XVIII, cuando el astrónomo Jean Jacques d'Ortous de Mairan demostró que las hojas de mimosa se cerraban naturalmente durante las noches, siguiendo un ritmo relacionado con el ciclo luz-oscuridad, y que este patrón se mantenía incluso en situaciones de oscuridad permanente (Sabater Gárrix, 2019). Actualmente se sabe que todos los seres vivos presentan comportamientos fisiológicos y biológicos sincronizados con los cambios ambientales. El principal sincronizador es el ciclo luz-oscuridad, el cual permite que la mayoría de los seres vivos ajusten su fisiología y su comportamiento a determinados momentos del día (Refinetti, 2016). Existe un oscilador o reloj interno que, en el caso de los mamíferos, se ubica en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, el cual es el principal regulador de estos cambios (Refinetti, 2016). Además de los sincronizadores fóticos, como la duración del día y la noche, existen otros moduladores no-fóticos que actúan más finamente como un mecanismo de calibración del reloj, incluyendo la temperatura ambiente, el ejercicio y la socialización (Refinetti, 2016). La mayoría de las investigaciones sobre los ritmos circadianos se han realizado en humanos y en organismos modelos tales como roedores e invertebrados (mosca de la fruta). Sin embargo, la investigación sobre los ritmos circadianos en animales de producción es escasa a pesar de su importancia económica y el creciente interés en el bienestar.

Entre los muchos ritmos que han sido descritos, destacan los presentados por algunos metabolitos tales como glucosa (Kumar, Challet & Kalsbeek, 2015) y ácidos grasos, hormonas como la melatonina (Wyse, Zhang, McLaughlin, Biello, Hough, Bellingham, Curtis, Robinson & Evans et al., 2018), cortisol (Fulkerson & Tang, 1979) y también los relacionados con la conducta, por ejemplo, el sueño-vigilia en humanos (Escames & Acuña-Castroviejo, 2009) y el patrón de actividad (consumo) y descanso en carneros estabulados (Pinto-Santini, Pérez-Clariget & Ungerfeld, 2021). Adicionalmente, en los machos de algunas especies con reproducción estacional como el ovino, el momento del año (fotoperiodo) influye fuertemente sobre la concentración de testosterona diaria, con valores superiores durante la fase de oscuridad temprana y mínimas al amanecer (Lincoln, 1976). No obstante, no es muy claro si las variaciones diarias en la concentración de testosterona pueden modificarse de acuerdo al momento del año.

En animales productivos [(ovejas (Pinto-Santini & Ungerfeld, 2019), caprinos (Kalyesubula, Casey, Reicher, Sabastian, Weinn, Bar Shira, Hoang, George, Shamay, Plaut & Mabweesh, 2021), vacunos (Lefcourt, Bitman, Kahl, Wood, 1993), equinos (Piccione, Arcigli, Costa, Fazio & Caola, 2003)] y humanos (Bueno & Wey, 2012) también se reportó la existencia de ritmicidad de la temperatura corporal. La regulación de la temperatura responde a un sistema integrado que comprende los ritmos u oscilaciones circadianas (sistema circadiano) y la regulación homeostática (Refinetti, 2020). En general, en animales endotermos de hábito diurno, la temperatura corporal aumenta al amanecer, llegando a un pico máximo en el atardecer donde comienza a bajar, hasta volver a subir al amanecer siguiente (Aschoff, 1965; Gerpe, 2014). También se ha reportado que hay una variación a lo largo del día de la temperatura superficial (De, Kumar, Kumar & Naqvi, 2017). En ovinos, la temperatura superficial determinada a nivel del ojo y otras zonas del rostro pueden utilizarse como indicador confiable de la temperatura corporal. En tal sentido, George, Godfrey, Ketring, Vinson & Willard (2014) reportaron que existe una alta

correlación entre la temperatura registrada a nivel del ojo y la temperatura rectal en vacunos de carne y en ovejas de pelo. Sin embargo, debido a las diferencias en la acrofase (hora en que ocurre el valor máximo) entre la temperatura superficial y la corporal, la temperatura superficial determinada a nivel del ojo podría no ser un buen indicador de la ritmicidad de la temperatura corporal (De et al., 2017; Giannetto, Arfuso, Giudice, Giancesella, Fazio, Panzera & Piccione, 2020), lo que no significa que su estudio no sea de importancia fisiológica. Adicionalmente, Pinto-Santini et al. (2021) reportaron que luego del aumento de la concentración de testosterona en carneros promovido por la administración de eCG, la temperatura del ojo se reduce por lo que, probablemente, la testosterona esté involucrada en los mecanismos de termorregulación, afectando la temperatura periférica de los machos. Finalmente, la información derivada de la investigación de los ritmos circadianos hormonales y de temperatura en los ovinos puede ser de importancia como herramienta para proponer cambios en el manejo de los animales con el fin de promover mejoras productivas y de bienestar, al comprender las variaciones en la concentración de testosterona en diferentes momentos del año y sus variaciones durante el día, al igual que los cambios en la temperatura corporal y periférica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cronobiología. Ritmos biológicos: importancia y componentes básicos

La cronobiología es la ciencia que estudia los cambios rítmicos, integrando el tiempo en la biología de los seres vivos, ya que este afecta su bioquímica, fisiología y comportamiento (Refinetti, 2016). De acuerdo con la frecuencia en que se presenten los ritmos se pueden clasificar en circadianos (frecuencia próxima al día; p.e. ciclo vigila-descanso en humanos, secreciones hormonales), infradianos (duración del ciclo mayor a un día; p.e. ciclo menstrual en la mujer) y ultradianos (duración del ciclo inferior a un día; p.e. ritmo cardiaco) (Refinetti, 2016). Sin embargo, para que un ritmo sea denominado circadiano, además de su frecuencia, debe generarse de forma endógena y sincronizarse de acuerdo a las condiciones ambientales (Refinetti, 2016).

Los ritmos circadianos han estado presentes desde el momento de la aparición de la vida en la Tierra (Madrid & Rol de Lama, 2006). Son consecuencia de una estrategia de adaptación y de supervivencia, involucrados en la anticipación a los cambios periódicos y previsibles del ambiente, como el día y la noche o las estaciones (Madrid & Rol de Lama, 2006). Además, los ritmos circadianos permiten que los organismos alcancen un grado de complejidad superior mediante la organización temporal de los procesos biológicos y la sincronización de billones de células que conforman un organismo complejo (Madrid & Rol de Lama, 2006).

El sistema circadiano de los mamíferos incluye cuatro componentes básicos:

(1) un marcapasos central de carácter endógeno o reloj localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) ubicados en el quiasma óptico del hipotálamo ventral, el que tiene oscilaciones cercanas a las 24 h, tal como se mencionó previamente, debido a la expresión rítmica de “genes reloj” (Migliaro, 2018). Los relojes biológicos son prácticamente inaccesibles, por lo que se recurre a vías indirectas para estudiarlos, principalmente las vías de salida (ritmo a estudiar: p.e. actividad motora, ritmos de alimentación y bebida, ritmo de la temperatura central y/o periférica (Gerpe, 2014).

(2) osciladores secundarios y vías de salida desde los núcleos supraquiasmáticos a los sistemas efectores necesarios para la expresión de los ritmos.

(3) vías de entrada de información lumínica (sincronizadores fóticos), que proporcionan directamente esta información al reloj y permiten la sincronización con el ciclo luz-oscuridad del medio externo. Los sincronizadores fóticos son considerados los más importantes para el sistema circadiano ya que permiten un ajuste fisiológico y de conducta de acuerdo al día y la noche. Hay múltiples estudios relacionados a cómo operan los sincronizadores fóticos en los mamíferos. La información lumínica es transmitida a los núcleos supraquiasmáticos a través del tracto retino-hipotalámico, el cual está formado por axones originados en una subpoblación de células ganglionares de la retina que no participan en la formación de imágenes conscientes (Refinetti, 2016).

(4) vías de entrada que llevan información sobre estado de alerta, aumento de actividad, temperatura ambiental, horarios de alimentación (sincronizadores no fóticos), que también

permiten sincronizar el reloj con el ambiente (Madrid & Rol de Lama, 2006; Refinetti, 2016). Algunos sincronizadores no fóticos pueden ser tanto salidas como entradas al sistema circadiano y también han sido denominados ‘tomadores del tiempo’ (Roenneberg & Merrow, 1998). El mecanismo exacto de acción de los sincronizadores no fóticos no es muy claro. Sin embargo, podrían actuar a través de un mecanismo de retroalimentación e incluir diversos metabolitos, hormonas y neurotransmisores (Webb, Antle & Mistlberger, 2014), los cuales, en presencia del ciclo luz-oscuridad pueden actuar como moduladores del ritmo circadiano. En ese sentido, Pinto-Santini & Ungerfeld (2019) reportaron que el ritmo circadiano de la secreción de cortisol y del metabolismo energético de las ovejas varía de acuerdo a la fase del ciclo estral, lo que pudiera indicar que los esteroides sexuales podrían actuar como moduladores no fóticos de los ritmos circadianos en la especie. En machos existe poca información al respecto. Sin embargo, recientemente Pinto-Santini et al., 2021 reportaron que la administración de eCG en carneros se vincula con cambios en la conducta (patrón de actividad y reposo) y en la variación diaria de la concentración de insulina, probablemente debidos al incremento en la concentración de testosterona promovidos por la eCG. El conocimiento de cómo estos sincronizadores afectan al ritmo circadiano de los animales de producción podría ser de importancia con el fin de obtener mejoras productivas y de bienestar, ya que el ritmo circadiano incide en las respuestas fisiológicas, metabólicas y conductuales de los animales (Webb et al., 2014).

2.2 Características de los ritmos biológicos

Los componentes de una variable rítmica, como las obtenidas cuando se estudian los ritmos circadianos (salidas del sistema circadiano), pueden analizarse mediante una función cosenoidal. A partir del ajuste de los datos reales a la función cosenoidales, es posible estimar las siguientes características de los ritmos biológicos:

- Período del ritmo: definido como el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos, es decir, la duración de un ciclo completo. En el caso de los ritmos circadianos, el periodo es ~ 24 h.
- Mesor: valor medio del ritmo de la variable estudiada, calculado a lo largo de un período completo.
- Amplitud: es la diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el período evaluado.
- Fase: valor instantáneo de una variable biológica en un momento dado. Para caracterizar 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; a este punto se lo denomina “acrofase” (Sabater Gárrix, 2019).
- Robustez: Confiabilidad de los datos de una variable rítmica.

En la Figura 1 se ejemplifican gráficamente las características del ritmo circadiano de la concentración de cortisol plasmático en humanos.

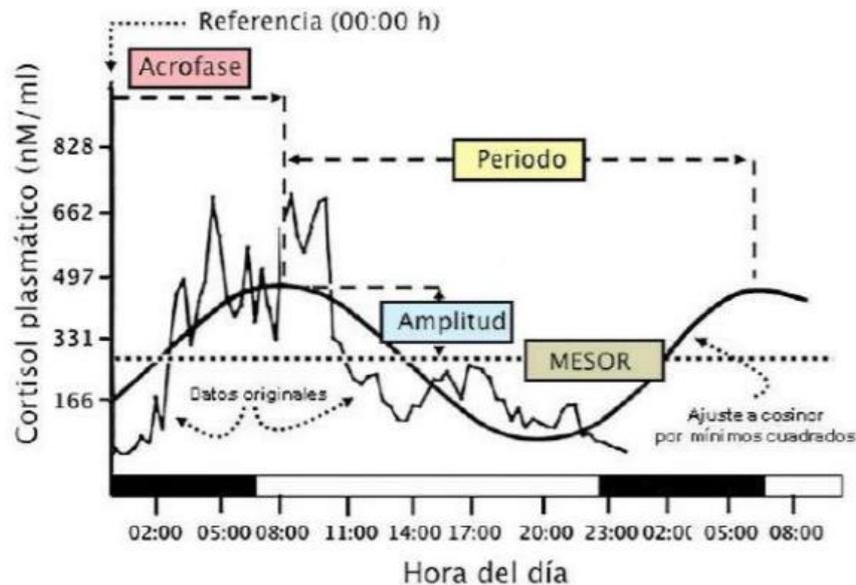


Figura 1. Características del ritmo circadiano de la concentración de cortisol en humanos (tomado de Sabater Gárrix, 2019).

2.3 Diferencias estacionales y variación diaria en la concentración de testosterona en carneros

Los ovinos presentan un patrón reproductivo estacional que se manifiesta cuando los días comienzan a ser más cortos (inicio del verano hasta el otoño), es decir, cuando el fotoperiodo pasa de creciente a decreciente. Este fenómeno es más pronunciado en las hembras, con menos efectos en los machos (Ungerfeld, Clemente & Orihuela, 2018). La melatonina cumple un papel fundamental en dicho fenómeno. La síntesis y liberación de esta hormona está acoplada al ciclo de luz-oscuridad y presenta una producción rítmica en un periodo de aproximadamente 24 h. La misma actúa indirectamente en el hipotálamo modulando los efectos de retroalimentación esteroidea en las neuronas productoras de GnRH (Lincoln, 1977). El aumento de esta hormona estimula la actividad gonadal en ovejas (patrón reproductivo estacional), presentándose los niveles más altos cuando los días son más cortos (fotoperiodo decreciente) (Ungerfeld, 2012).

La amplitud y la frecuencia de los pulsos de testosterona varían de acuerdo a la raza en forma diferente de acuerdo al momento del año. D'Occhio & Brooks (1983) demostraron que carneros de raza Suffolk, Border Leicester y Romney Marsh mantenidos a una latitud de 35° S, presentaron mayor frecuencia y amplitud de pulsos de testosterona al final del verano y principios de otoño. En cambio, carneros Poll Dorset presentaron niveles más altos de testosterona durante un periodo más prolongado que se extendió desde finales de invierno hasta el otoño. En Uruguay, Pérez-Clariget, Forsberg & Rodríguez-Martínez (1998) encontraron mayores niveles de testosterona durante el verano y principios de otoño en carneros Corriedale y Merino, mientras que la concentración mínima se obtuvo a finales del otoño. En los carneros Corriedale, se reducen tanto la concentración de testosterona como la calidad espermática del semen durante la estación no reproductiva (Pérez-Clariget et al., 1998; Ungerfeld, 2012).

Lincoln (1976) pudo demostrar que el ritmo de secreción de la hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y testosterona en carneros presenta una ritmicidad circadiana. Los niveles más altos de estas hormonas se observan entre 09:00y11:00 h luego del amanecer, es decir, entre las 17:00 y las 20:00 h, en la fase temprana de oscuridad del ciclo de 24 h, mientras que los niveles más bajos se observan entre las 09:00 y las 12:00 h, en la fase de luz temprana. Adicionalmente, Ortavant, Daveau, Garnier & Pelletier (1982) obtuvieron la mayor frecuencia de pulsos de LH y testosterona entre 3 y 9 h luego del amanecer y además, en el otoño, se presenta otra fase de alta actividad de secreción en la noche.

La liberación nocturna de melatonina es la señal que traduce la información fotoperiódica a los centros hipotalámicos que controlan la liberación de hormonas hipofisarias como LH y FSH (Lincoln & Davidson, 1977; Forsberg, 2002). Según Lincoln (1976) los carneros expuestos a días cortos (16 h oscuridad: 8 h luz) presentan niveles basales más altos y mayor frecuencia de pulsos de LH, FSH y testosterona 2 a 3 semanas luego de la exposición a ese fotoperiodo. Por otro lado, en condiciones de mayor cantidad de horas de luz (16 h luz: 8 h oscuridad) los carneros mostraron niveles significativamente menores de FSH, LH y testosterona luego de 2 a 3 semanas, además de una marcada regresión testicular (Lincoln & Davidson, 1977).

2.4 Testosterona: Rol metabólico y termorregulatorio

La testosterona cumple un rol fundamental en la reproducción, incluyendo el desarrollo y mantenimiento de la libido y los rasgos corporales generales asociados a la masculinidad (Ungerfeld, 2012). Sin embargo, en ovinos también es considerada una hormona metabólica, ya que favorece la síntesis proteica y la sensibilidad a la insulina a nivel hepático y muscular, además de que actúa a nivel central en el mecanismo de regulación del consumo y gasto energético (Clarke, Clarke, Rao, Cowley & Henry, 2012). En corderos, la restricción de alimentos reduce la grasa corporal y la concentración de leptina, incrementando la concentración de testosterona y mejorando algunas características seminales (Abdel-Aziz, Ayadi, Alhidary, Alowaimer & Abouheif, 2016). Estos resultados pudieran relacionarse con el menor flujo sanguíneo hacia el hígado, producto de la reducción de la ingesta, el cual reduce la metabolización de las hormonas esteroideas y por lo tanto su concentración sanguínea aumenta (Vasconcelos, Sangsritavong, Tsai & Wiltbank, 2003).

Clarke et al. (2012) reportaron que existen diferencias entre sexos en la termorregulación de los ovinos. En machos castrados, la administración de testosterona reduce el gasto energético mediante la reducción de la temperatura de la musculatura esquelética en reposo y la concentración de glucosa postprandial. Este efecto en la producción de calor en el músculo esquelético de los machos está dado por una mayor cantidad de receptores de andrógenos a nivel central (área preóptica rostral y caudal) (Clarke et al., 2012). Adicionalmente, la testosterona puede estar involucrada en el sistema homeostático, para mantener la temperatura corporal dentro del rango fisiológico a través de sus efectos vasodilatadores a nivel 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).

2.5 Ritmicidad de la temperatura corporal y algunos factores que la afectan

Los mamíferos son animales homeotermos, es decir, regulan su fisiología y comportamiento para mantener un equilibrio entre la producción y la disipación de calor para mantener su temperatura en un rango constante (Refinetti, 2016). Esta regulación depende tanto del sistema circadiano como del homeostático, estando ambos integrados. El sistema circadiano genera la amplitud de la variación diaria de la temperatura, y simultáneamente pero independientemente, el sistema termorregulatorio establece los límites de variación permitida dentro de esa amplitud (Refinetti, 2020). Es decir, 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).

El patrón circadiano de la temperatura se relaciona con la actividad motora y el metabolismo, por lo que varía de acuerdo al hábito, diurno o nocturno de la especie (Lowe, Cook, Ingram & Haris, 2001). En ovinos, la mayor temperatura corporal se presenta durante la fase activa del día y la temperatura corporal es más baja durante la fase inactiva (Maloney, Meyer, Blache & Fuller, 2013). Piccione & Refinetti (2003) reportaron que en ovinos la acrofase de la temperatura corporal ocurre entre las 09:00 y las 14:00 h.

Varios factores pueden alterar el ritmo circadiano de la temperatura corporal en los ovinos. Algunos de los principales son la alimentación, el metabolismo y la temperatura ambiente la cual varía según la estación del año. Respecto a la alimentación, Maloney et al. (2013) reportaron que la restricción alimenticia (70% de la energía de mantenimiento), reduce la temperatura corporal principalmente durante la fase nocturna del día. Lo mismo ocurre en ovejas mantenidas en ayuno por 48 h (Piccione, Caola & Refinetti, 2002). La amplitud del ritmo circadiano de la temperatura corporal en ovinos se reduce de acuerdo al nivel de alimentación, pero esto no ocurre con su acrofase, demostrando la relación existente entre la temperatura corporal y el metabolismo de los animales (Piccione et al., 2002; Maloney, 2013). Por otro lado, Piccione & Refinetti (2003) demostraron que el mayor aumento en la termogénesis diaria se asocia con el momento de la alimentación en ovejas que eran alimentadas una vez por día (en la mañana).

En las diferentes estaciones del año se presentan cambios en la duración del día que impactan sobre la concentración de testosterona y posiblemente sobre su variación diaria, de acuerdo a la estación. Además del fotoperiodo, en las diferentes estaciones también se producen cambios en la temperatura ambiente, como se mencionó previamente. Así, durante el verano, hay mayores concentraciones de testosterona, debido a que la duración de las horas de luz comienza a disminuir, pero la temperatura ambiente es mayor. De et al. (2017), evaluando el ritmo circadiano de la temperatura rectal en ovejas en invierno y verano, reportan que el mesor es similar a pesar de la variación en la temperatura ambiental de las estaciones evaluadas. Por otra parte, la temperatura superficial se vio afectada por la temperatura ambiental, siendo mayor en verano en todas las mediciones respecto al invierno, provocando diferencias significativas en el mesor. No obstante, se registraron diferencias significativas entre estaciones a las 12:00, 15:00, 00:00, 06:00 y la acrofase se registró a las 15:00 h en verano. Los esteroides sexuales 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 podría afectar la temperatura corporal de los machos y su ritmicidad diaria.

3. HIPÓTESIS

En febrero (verano) los carneros tienen mayor concentración de testosterona y su variación diaria presenta mayor amplitud y robustez que en agosto (invierno). La acrofase de la concentración de testosterona se presenta al final del día (después del atardecer) en ambos momentos del año.

La temperatura corporal periférica es mayor al amanecer y es mínima durante las horas de oscuridad (en la madrugada), independientemente del momento del año.

El ritmo circadiano de la temperatura superficial periférica presenta una menor amplitud y robustez en febrero que en agosto.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el ritmo circadiano de la concentración de testosterona y de la temperatura superficial en carneros Corriedale estabulados en dos momentos del año (agosto y febrero).

Objetivos específicos

Comparar la concentración de testosterona y su patrón de variación diario durante agosto y febrero en carneros.

Comparar el ritmo circadiano de la temperatura superficial, evaluada a nivel rostral con el uso de cámara infrarroja, durante agosto y febrero en carneros.

5. MATERIALES Y METODOS

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 de la Facultad de Veterinaria (CEUAFVET-1027 111900-000054-20). El experimento se realizó en Facultad de Veterinaria durante los meses de agosto y febrero. Se utilizó un grupo de 10 carneros de la raza Corriedale, adultos (peso corporal $63,4 \pm 7,3$ kg; condición corporal: $3,5 \pm 0,5$; media \pm DE; edad: 3-4 años), identificados con caravanas, y mantenidos en condiciones similares de alimentación y espacio a lo largo de todo el trabajo. Los mismos carneros fueron utilizados en dos momentos diferentes del año, verano (enero – febrero) e invierno (julio – agosto), a los mismos se les realizó un periodo de acostumbamiento de 21 días en cada momento del año.

Los carneros fueron alimentados de forma individual dos veces al día (07:30-08:30 h y 15:30-16:30 h) con heno de alfalfa (*Medicago sativa*) (1,0 kg por animal por día; ~85% de materia seca [MS], ~ 18% de proteína cruda [PC]) y alimento concentrado comercial (250 g por animal por día, ~ 88% MS, ~ 14% PC), de acuerdo con sus requisitos de mantenimiento (NRC, 2007), y mantuvieron libre acceso a bloques minerales y agua durante todo el día. Durante las horas de luz natural los carneros eran mantenidos en corrales colectivos (mientras no se efectuaban las mediciones) y, corrales individuales (durante la fase experimental) a cielo abierto. Los corrales fueron hechos de cercos galvanizados de aluminio contando con sombra y agua *ad libitum*. El alojamiento en corrales individuales de la fase experimental se realizó durante 21 días previos a las mediciones, acompañado de una fase de acostumbamiento mediante cepillado diario por 5 min en la zona dorsal, desde la zona cervical hasta el área lumbosacra, procedimiento que se realizó para disminuir el temor a la captura y sujeción de los animales para los muestreos seriados de sangre (Pinto-Santini & Ungerfeld, 2019). Durante las noches, los carneros eran alojados en corrales colectivos sin iluminación artificial.

5.2 Tratamientos

Los tratamientos fueron los momentos-épocas de medición:(1) febrero (verano): caracterizado por presentar un fotoperiodo decreciente y mayores temperaturas ambientales; (2) agosto (invierno): caracterizado por presentar un fotoperiodo creciente y menores temperaturas ambientales.

5.3 Variables ambientales

Durante los muestreos de cada momento del año se midió, con un termohigrómetro digital portátil colocado a la altura de los animales, la temperatura ambiental y humedad relativa cada hora. Como puede observarse en la Figura 2a, la temperatura ambiental varió durante el día tanto en agosto como febrero. En ambos momentos del año las mayores temperaturas ambientales se presentaron cerca del mediodía ($22,7$ °C y $23,5$ °C para agosto y febrero, respectivamente). No obstante, en febrero se registró otro pico de temperatura antes del atardecer, siendo este el punto de mayor valor en ese momento del año (24 °C). Por otro lado, los niveles más bajos de temperatura se dieron durante la fase de oscuridad ($8,8$ °C y $18,2$ °C en agosto y febrero, respectivamente). En la Figura 2b, se presentan los valores de la humedad relativa. Los valores máximos de humedad se presentan durante las horas de oscuridad, siendo notoriamente

superiores en agosto, al punto de aproximarse al 100% de humedad ambiental, mientras que la humedad mínima se presenta durante las horas de luz.

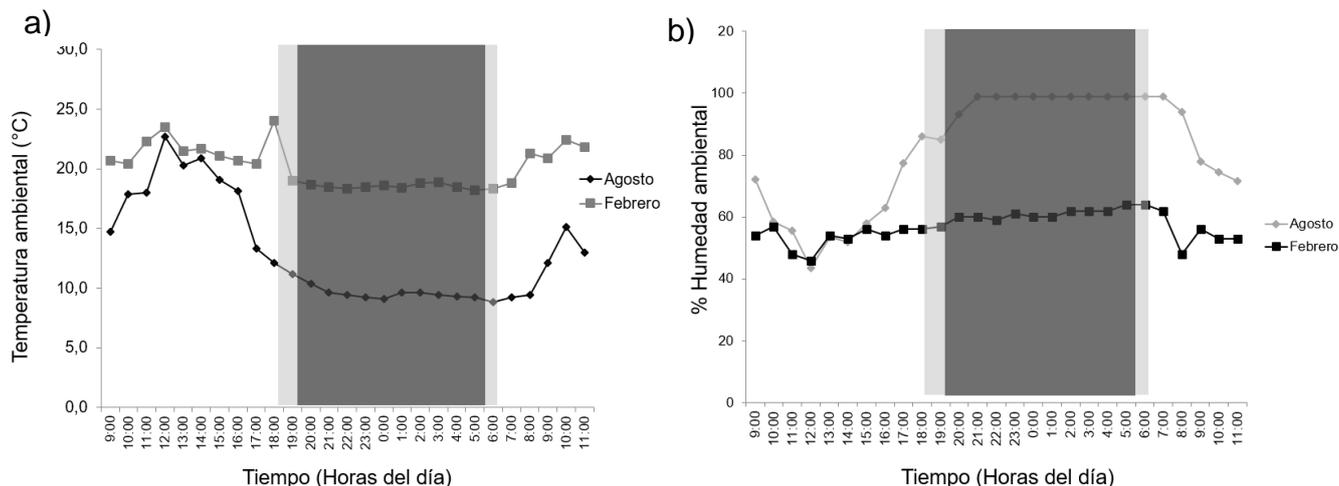


Figura 2. Temperatura ambiental (a) y humedad relativa (b) en los dos días de muestreo, en los meses de agosto y febrero. El área sombreada representa las fases de oscuridad (Gris oscuro: febrero. Atardecer: 19:42 h, amanecer: 06:19 h; Gris claro: agosto. Atardecer: 18:25 h, amanecer: 06:56h).

5.4 Variables evaluadas

Culminado el periodo de acostumbramiento de cada época de evaluación, se determinó la temperatura superficial a nivel ocular y rostral y, las concentraciones de testosterona mediante sangrado en diferentes horas. Las mediciones se realizaron por un periodo de 26 h continuas, iniciando a las 09:00 h del primer día y culminando a las 11:00 h del día siguiente.

5.4.1 Concentración de testosterona

Las muestras de sangre para la determinación de la concentración de testosterona se tomaron individualmente a nivel de la vena yugular, en los siguientes horarios: 9:00, 10:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 22:00, 00:00, 03:00, 06:00, 09:00 y 11:00 h. La sangre se trasvasó a tubos sin aditivos para ser centrifugada en los primeros 20 min posteriores a la toma de muestra. El suero se congeló a -20 °C para la determinación de la concentración de testosterona por radioinmunoanálisis (Kit TESTO-CT2, Cisbio Bioassays, Francia). El coeficiente de variación intraensayo fue 14,8%, 11,7% y 7,6% para los controles de calidad bajo, medio y alto, respectivamente). El límite de detección del ensayo fue de 0,16 nmol/L.

5.4.2 Temperatura superficial tomada a nivel del ojo, nariz, hocico y oreja.

Se registró, cada hora, la temperatura superficial del ojo y región rostral de cada carnero con una cámara infrarroja. Las imágenes termográficas se analizaron utilizando el software FLIR Tools. Las áreas del ojo, la fosa lagrimal externa proximal y distal, la base de la oreja y la nariz se

delinearon a partir de las imágenes infrarrojas (Pinto-Santini et al., 2021; Figura 3). Encada área, las temperaturas mínima, media y máxima fueron calculadas por el software y analizadas usando la herramienta de función de medida de elipse del software. Se analizó la temperatura máxima en cada región anatómica de cada imagen capturada (George et al., 2014).

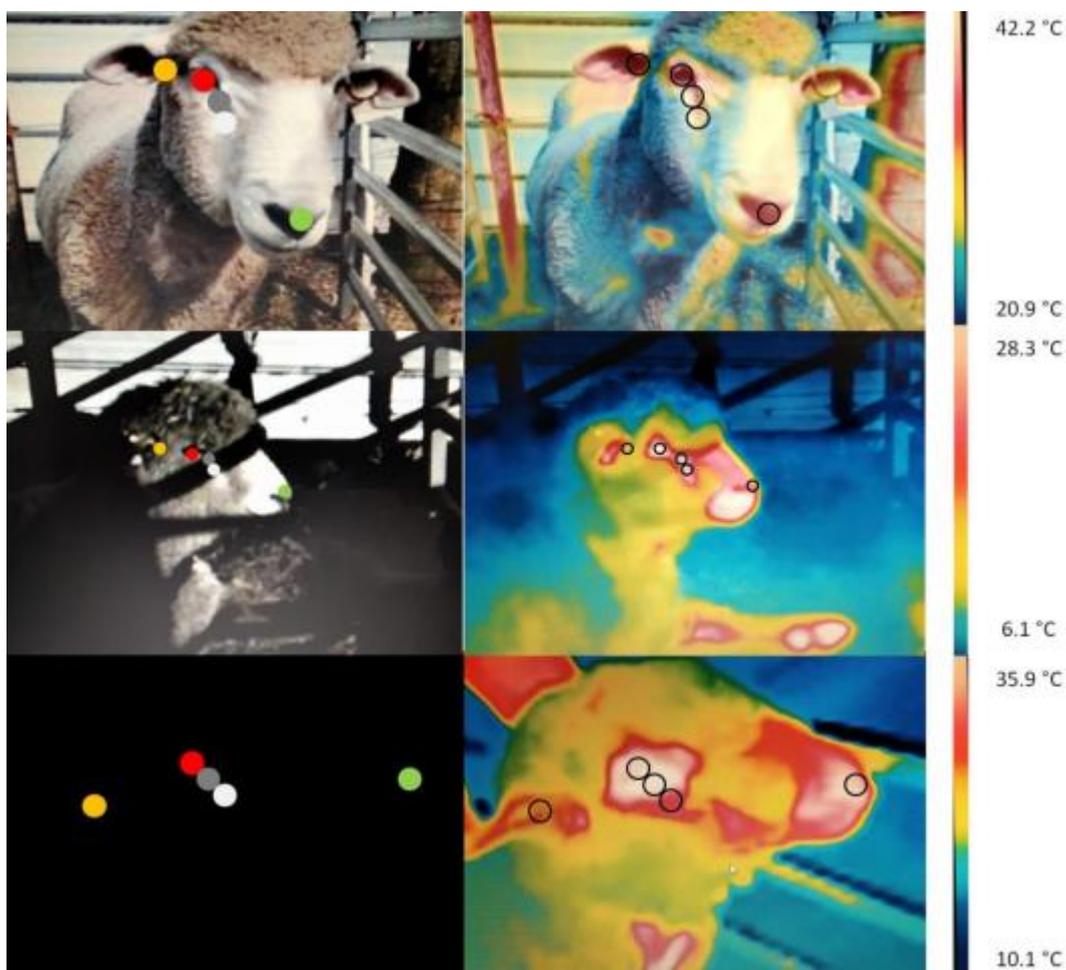


Figura 3. Imágenes que ilustran las regiones anatómicas en la que se hicieron las determinaciones de la temperatura: imagen fotográfica (izquierda) e imagen termográfica infrarroja (derecha) de la cara de los carneros. ● Ojo completo; ● Lagrimal proximal; ● Lagrimal distal; ● Base de la oreja; ● Hocico (Fuente: Pinto-Santini et al., 2021).

5.5. Análisis estadístico

Todas las variables se analizaron con un modelo mixto (proc mixed; SAS, University Edition). El modelo incluyó como efectos fijos el tratamiento (febrero vs agosto), el tiempo de medición y la interacción entre tratamiento y tiempo. La mejor estructura de varianza-covarianza se seleccionó de acuerdo con Littell, Henry & Ammerman (1998). La estimación y comparación de las medias se realizó con las instrucciones PDIF de SAS.

Además, se utilizó un análisis cosinor para generar las características del ritmo circadiano (Programa Cosinor.exe, versión 3.1 desarrollado por Refinetti, 2015). Las características del ritmo

determinadas fueron: amplitud (la mitad de la diferencia entre los valores más alto y más bajo), mesor (el nivel medio de un ritmo), acrofase (el momento en que ocurre el pico de un ritmo), y robustez (fuerza de la ritmicidad). Para este análisis se asumió que el período del ritmo es de 24 h. Estos datos se compararon entre tratamientos utilizando un modelo mixto. Los resultados se consideraron significativamente diferentes cuando $P \leq 0,05$ y como tendencias cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración de testosterona

La concentración de testosterona solo fue afectada por el tratamiento. La mayor concentración se presentó en febrero ($11,9 \pm 0,8$ nmol/L vs $5,8 \pm 0,8$ nmol/L en febrero y agosto respectivamente; $P < 0,0001$; Figura 4). Respecto a las características del patrón de variación diaria, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en la amplitud, robustez y acrofase (Cuadro 1). Sin embargo, el mesor fue significativamente superior en febrero que en agosto ($P < 0,05$; Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias estimadas \pm EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano de la concentración de testosterona en los carneros en diferentes momentos del año (agosto y febrero).

Variable	Tratamiento	Mesor	Amplitud	Acrofase	Robustez
Testosterona(nmol/L)	Agosto	$6,0 \pm 0,8^b$	$4,2 \pm 0,7$	$18:18 \pm 0,8$	$29,5 \pm 3,5$
	Febrero	$13,1 \pm 0,8^a$	$4,1 \pm 0,7$	$17:48 \pm 0,8$	$23,1 \pm 3,5$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

6.2 Temperatura superficial medida a nivel del ojo, nariz, oreja y hocico

En el Cuadro 2 se observan las medias estimadas y la probabilidad de los efectos principales evaluados de la temperatura superficial registrada en el ojo y otras zonas del rostro. En todos los casos, la temperatura superficial fue afectada por el tratamiento ($P < 0,03$), el tiempo ($P < 0,001$) y la interacción entre tratamiento y tiempo ($P < 0,005$), con excepción de la temperatura registrada a nivel del centro del ojo cuya interacción no fue significativa. Las temperaturas máximas de las variables evaluadas se dieron en horas cercanas al mediodía en febrero y agosto (Figuras 5a, 5b, 5c; Figuras 6a, 6b, 6c, 6d). Por otra parte, en ambos tratamientos las temperaturas más bajas de todas las zonas evaluadas se presentaron en la fase de oscuridad.

Respecto a las características del patrón de variación diaria, el mesor de las variables fosa lagrimal proximal externa, fosa lagrimal distal externa y base de la oreja fue significativamente superior en febrero que en agosto ($P = 0,0008$; $P = 0,0006$, $P = 0,001$, respectivamente; Cuadro 3). La amplitud fue superior en agosto que en febrero en el ojo completo ($P = 0,0007$), fosa lagrimal proximal externa ($P = 0,0002$), fosa lagrimal distal externa ($P = 0,0006$) y base de la oreja ($P = 0,02$) (Cuadro 3). Por otro lado, la acrofase ocurrió más tarde en febrero que en agosto en las variables ojo completo ($P = 0,008$) y hocico ($P = 0,01$) (Cuadro 3). La robustez fue significativamente superior en agosto en fosa lagrimal proximal externa y fosa lagrimal distal externa ($P = 0,01$; $P = 0,003$, respectivamente), y se manifestó como una tendencia en ojo completo siendo mayor en agosto que febrero ($P = 0,1$; Cuadro 3).

Cuadro 2. Medias estimadas \pm EE (error estándar) y principales efectos del momento del año (agosto y febrero), hora del día (tiempo) e interacción entre tratamiento y tiempo en la temperatura superficial determinada a nivel del ojo y región rostral en carneros.

Variable	Tratamiento			P-valor		
	Agosto	Febrero	EE	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x tiempo
Centro del ojo	32,2	34,1	0,19	<0,0001	<0,0001	ns
Pupila	32,6	34,9	0,17	<0,0001	<0,0001	<0,005
Ojo completo	33,4	34,9	0,15	<0,0001	<0,0001	<0,005
Lagrimal proximal	32,7	34,6	0,16	<0,0001	<0,0001	<0,005
Lagrimal distal	31,4	33,9	0,18	<0,0001	<0,0001	<0,005
Hocico	32,0	32,5	0,18	0,03	<0,0001	<0,005
Base de la oreja	29,4	31,8	0,28	<0,0001	<0,0001	<0,0001

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

Cuadro 3. Medias estimadas \pm EE (error estándar) de las características del ritmo circadiano de la temperatura en diferentes puntos de la superficie rostral de los carneros en diferentes momentos del año (agosto y febrero).

Variable	Tratamiento	Mesor	Amplitud	Acrofase	Robustez
Ojo completo	Agosto	30,2 \pm 2,1	1,6 \pm 0,1 ^a	09:54 \pm 1,0 ^b	24,3 \pm 4,6†
	Febrero	34,8 \pm 2,1	0,6 \pm 0,1 ^b	14:24 \pm 1,0 ^a	13,2 \pm 4,6†
Fosa lagrimal proximal	Agosto	32,5 \pm 0,3 ^b	2,0 \pm 0,1 ^a	12:01 \pm 0,9	22,7 \pm 2,8 ^a
	Febrero	34,5 \pm 0,3 ^a	0,9 \pm 0,1 ^b	13:30 \pm 0,9	12,2 \pm 2,8 ^b
Fosa lagrimal distal	Agosto	31,2 \pm 0,4 ^b	2,8 \pm 0,3 ^a	12:36 \pm 0,9	29,6 \pm 3,3 ^a
	Febrero	33,8 \pm 0,4 ^a	1,1 \pm 0,3 ^b	12:48 \pm 0,9	13,7 \pm 3,3 ^b
Hocico	Agosto	31,6 \pm 0,5	1,4 \pm 0,3	10:42 \pm 0,4 ^b	20,8 \pm 4,9
	Febrero	31,8 \pm 0,5	1,7 \pm 0,3	12:36 \pm 0,4 ^a	24,3 \pm 4,9
Base de la oreja	Agosto	29,1 \pm 0,4 ^b	2,9 \pm 0,3 ^a	12:30 \pm 1,1	21,7 \pm 3,6
	Febrero	31,7 \pm 0,4 ^a	1,6 \pm 0,3 ^b	11:18 \pm 1,1	17,9 \pm 3,6

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

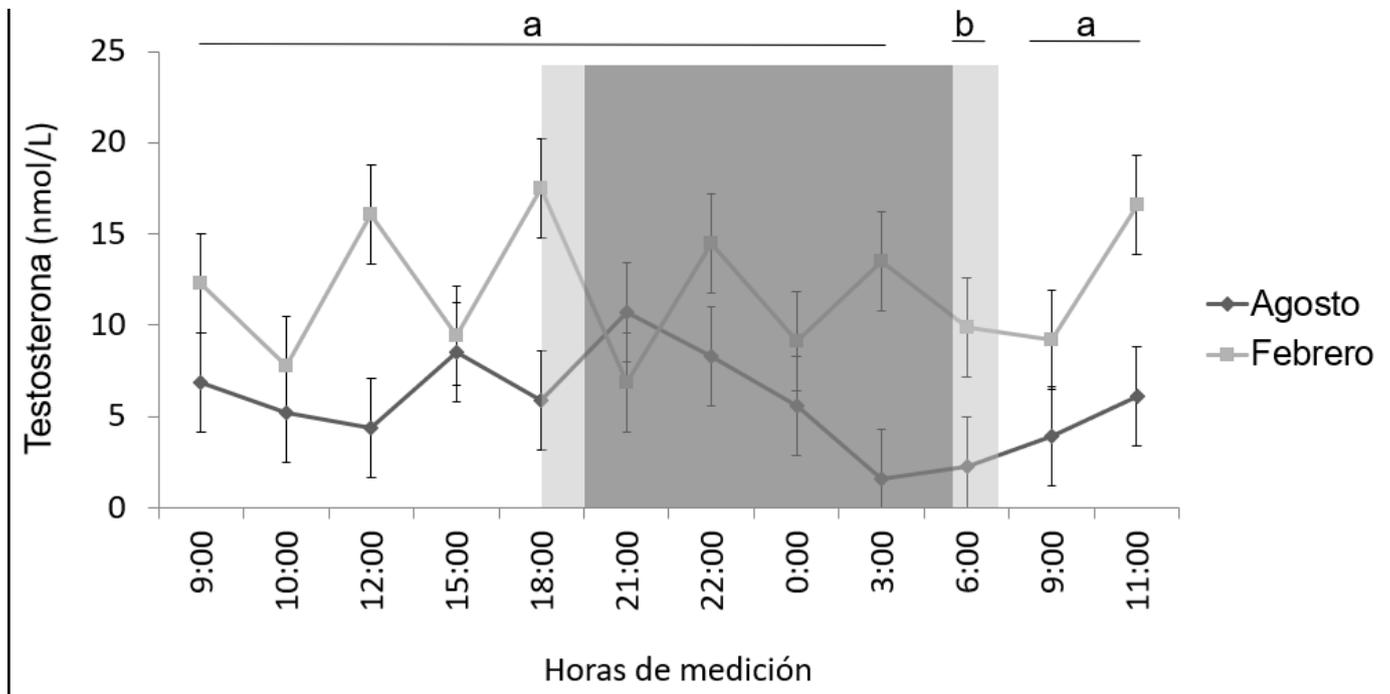
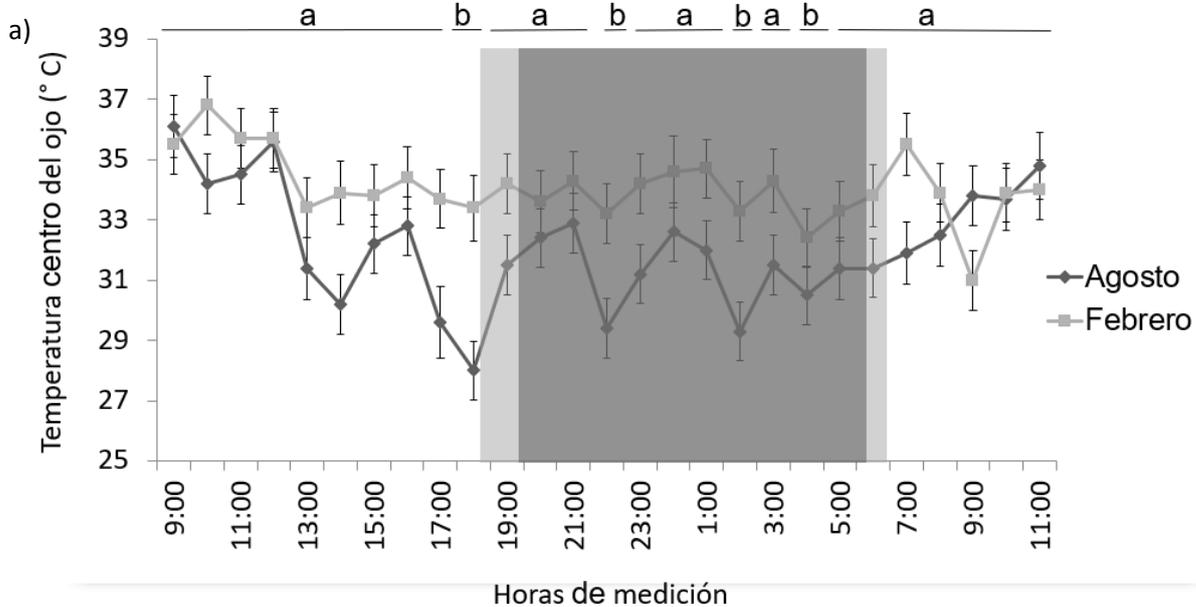


Figura 4. Concentración de testosterona en función del tiempo (horas) en agosto y febrero. (Gris oscuro: febrero. Atardecer: 19:42, amanecer: 6:19; Gris claro: agosto. Atardecer: 18:25, amanecer: 6:56; **: Altamente significativo; *: significativo; letras: diferencias significativas entre tratamiento y tiempo).



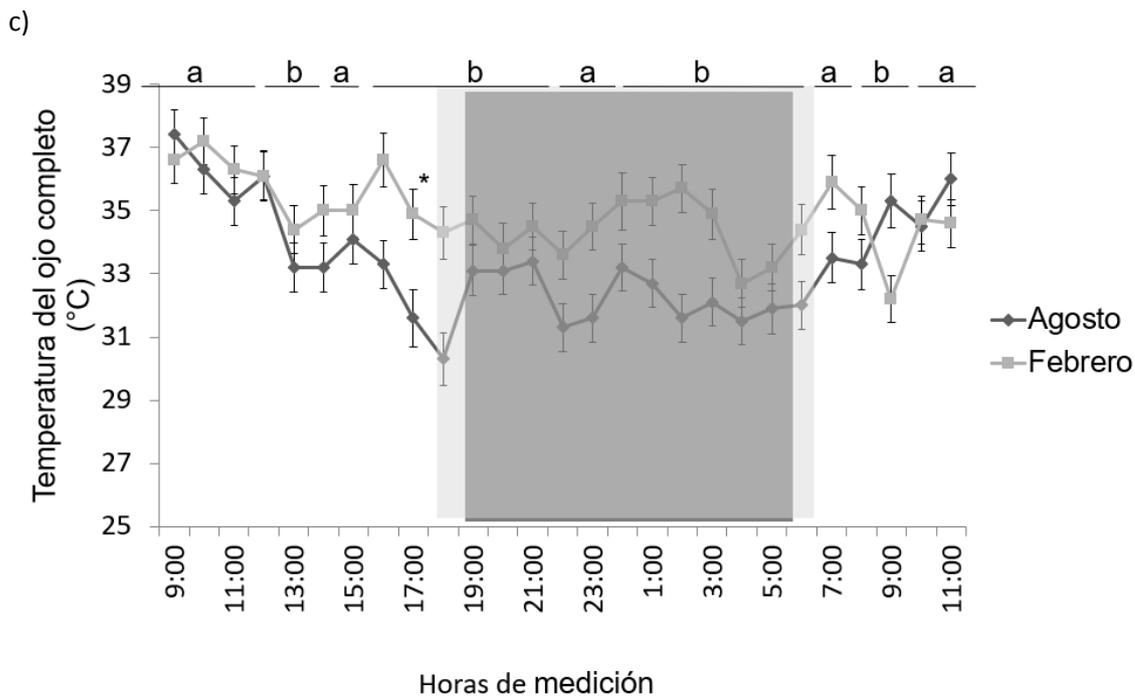
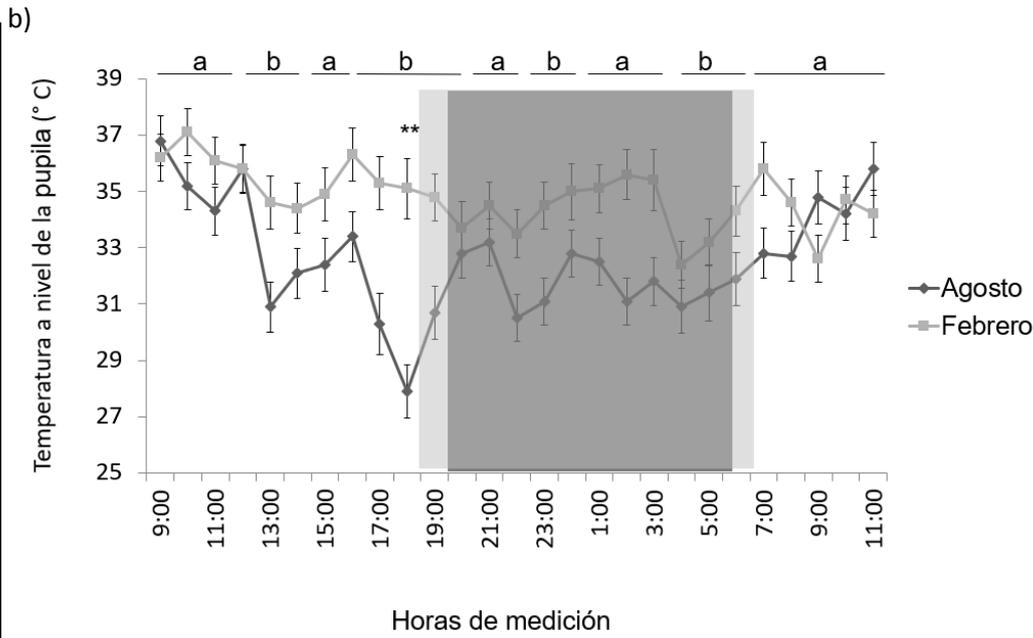
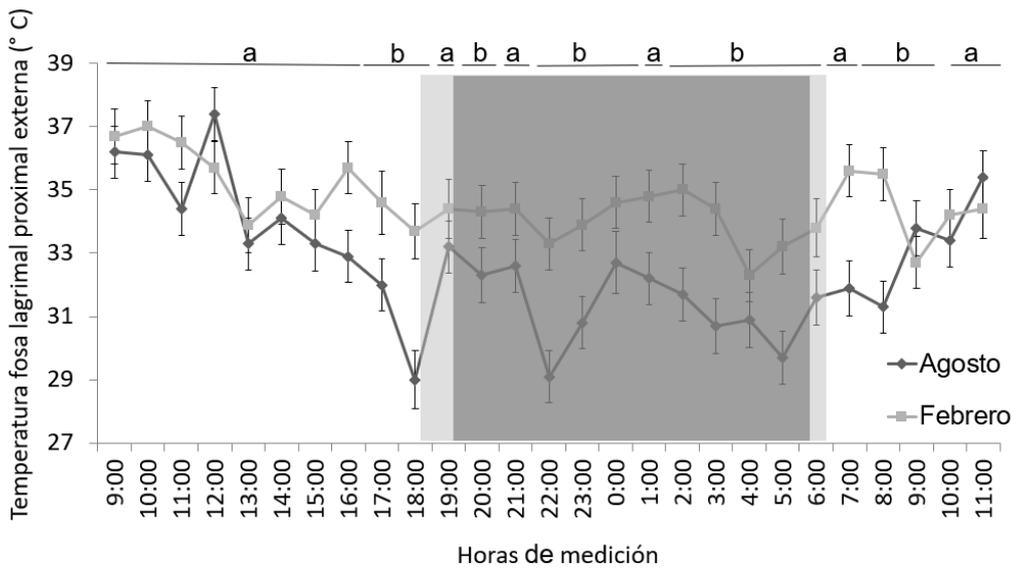
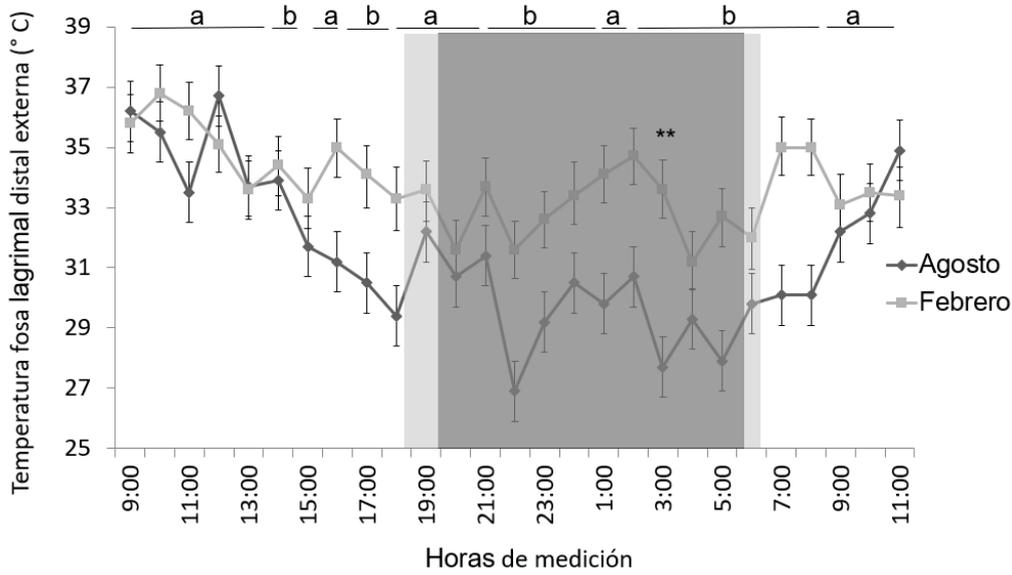


Figura 5. Variación de la temperatura durante el día en: a) centro del ojo; b) pupila; c) ojo completo; (Gris oscuro: febrero. Atardecer: 19:42, amanecer: 6:19; Gris claro: agosto. Atardecer: 18:25, amanecer: 6:56; **: Altamente significativo; *: significativo; letras: diferencias significativas entre tratamiento y tiempo).

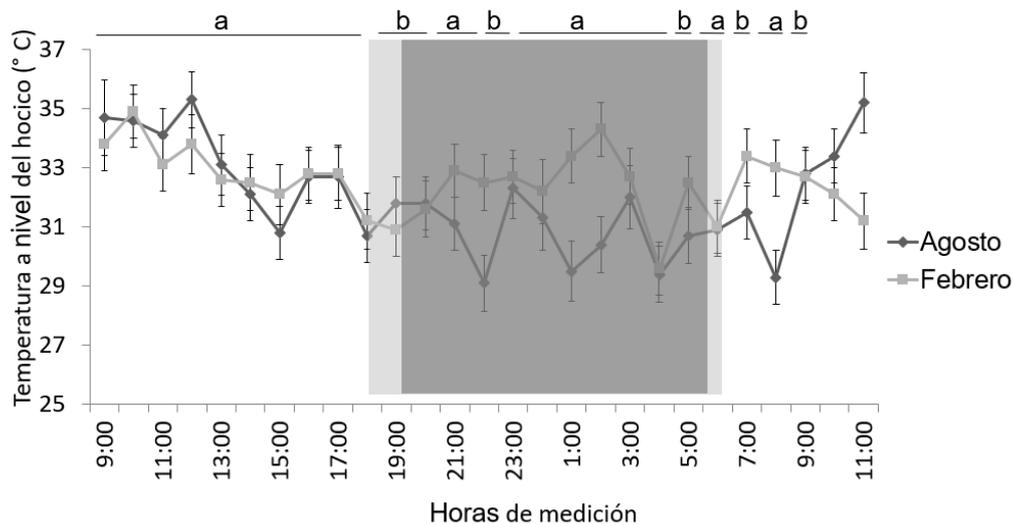
a)



b)



c)



d)

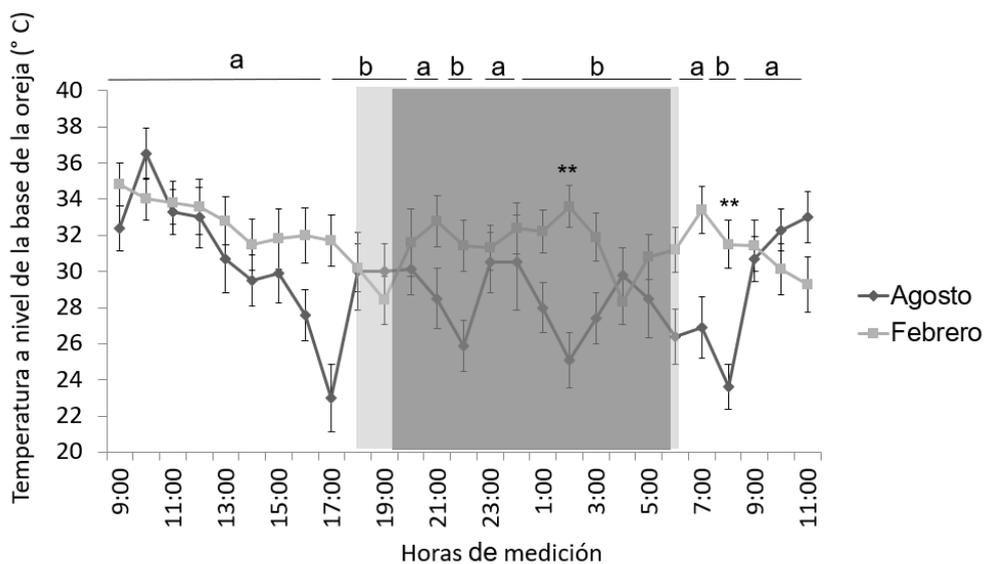


Figura 6. Variación de la temperatura durante el día en: a) fosa lagrimal proximal externa; b) fosa lagrimal distal externa; c) hocico; d) base de la oreja. (Gris oscuro: febrero. Atardecer: 19:42, amanecer: 6:19; Gris claro: agosto. Atardecer: 18:25, amanecer: 6:56; **: Altamente significativo; *: significativo; letras: diferencias significativas entre tratamiento y tiempo).

7. DISCUSIÓN

El mesor fue la única característica del patrón de variación diario de la concentración de testosterona que fue afectada por el momento del año. El mayor mesor en la concentración de testosterona en febrero coincide con reportes previos en nuestra latitud (Pérez-Clariget et al., 1998; Ungerfeld, 2012). En tal sentido, en condiciones a pastoreo, Pérez-Clariget et al. (1998) reportaron incrementos en la concentración de testosterona, tanto en carneros Corriedale como en Merino, entre enero y abril (mitad del verano y comienzos de otoño) y, concentraciones más bajas de testosterona entre mayo y septiembre (final del otoño e invierno). De forma similar, Ungerfeld (2012) reportó que en carneros Corriedale y Milchschaaf (entre 1-2 años), el máximo desarrollo reproductivo se presenta en enero, la fase de regresión de la actividad reproductiva comienza en mayo y, la menor actividad reproductiva se presenta en agosto. Como se señaló previamente, los cambios en el mesor no se acompañaron de variaciones en la amplitud ni robustez del ritmo, indicando que la variación en la concentración de testosterona durante el día es estable independientemente del momento del año.

Con relación a la hora en que se produce el valor máximo de testosterona (acrofase), en ambos momentos del año se presentó al final de la tarde (~18:00 h). A pesar de que hubo una diferencia de 48 min en la hora del amanecer entre febrero y agosto, la misma no fue suficiente para causar modificaciones en la acrofase. En tal sentido, Ortavant et al. (1982) reportaron que la hora en que comienza la fase luminosa del día podría constituir una señal sincronizadora para la liberación de LH y, en consecuencia, de testosterona. Basado en este reporte y en los resultados de la presente tesis, el pico de la concentración de testosterona se presenta alrededor de 12 h después del amanecer, siendo que el mismo ocurre al final de la fase luminosa durante febrero, y al inicio de la fase de oscuridad en agosto. Otra posible explicación podría ser la señalada por Lincoln & Davidson (1977), quienes reportaron que las mayores concentraciones de testosterona en carneros se presentan al final de la tarde, inicio del periodo de oscuridad, asociando estas con la fase del día con menor actividad de los animales. Resultados similares fueron recientemente reportados en vacunos (Perumal, De, Alyethodi, Savino, Khate, Vupru & Khan, 2021). Aunque se desconoce el rol de la mayor concentración de testosterona a finales de la tarde, la misma podría ser necesaria para algunos procesos metabólicos efectuados durante la fase oscura del día, así como asociarse con cambios conductuales relacionados con el ciclo de descanso-vigilia, tal como fue reportado por Pinto-Santini et al. (2021).

Respecto a la temperatura superficial, como era de esperarse debido al incremento de las temperaturas ambientales, se presentaron valores medios (mesor) superiores en febrero que en agosto. En tal sentido, en bovinos (Vaidya, Kumar & Singh, 2010) y ovinos (De et al., 2017; Reyes, Herrera, Marquina, D'Enjoy & Pinto-Santini, 2018) existe una relación directa, tanto de la radiación solar como de la temperatura ambiente con la temperatura superficial. En relación a la acrofase, en ambos momentos del año esta coincide con las horas de máxima temperatura ambiental, siendo más tardía en febrero (ojo completo y hocico). La amplitud del ritmo de la temperatura superficial también varió con el momento del año. En febrero se observó una menor amplitud en la variación diaria de la temperatura superficial en todas las zonas evaluadas, con la excepción de la temperatura superficial tomada a nivel del hocico. Si bien estos resultados podrían relacionarse con cambios en la exposición térmica durante el día, también podría deberse a modificaciones en la irrigación sanguínea. En tal sentido, probablemente la vasodilatación del

lecho capilar de la piel a nivel rostral, para la disipación de calor, fue más activa en febrero (verano) que en agosto (invierno) y durante las horas de mayor temperatura ambiental, es decir, probablemente hubo una mayor eficiencia del mecanismo de termorregulación, tal como ha sido reportado en ovinos bajo condiciones de ambientes cálidos (Maloney et al. (2013). La mayor concentración de testosterona presentada en febrero podría estar implicada en el mecanismo termorregulador previamente mencionado. En tal sentido, reportes recientes demostraron que la administración de eCG, la que provoca un aumento de la concentración de testosterona, se relaciona con una menor temperatura superficial en carneros (Pinto-Santini et al. 2021), lo cual pudiera deberse a los efectos vasodilatadores de la testosterona (Clarke et al., 2012).

8. CONCLUSIONES

En comparación con agosto, los mayores niveles de testosterona durante febrero no estuvieron acompañados de cambios en su patrón de variación diario (amplitud y acrofase), demostrando que el mismo es bastante estable y/o poco susceptible a otros factores ambientales. Contrariamente, hubo una importante asociación entre el patrón de variación de la temperatura superficial y el de la temperatura ambiente durante el día, observándose también, una menor amplitud de la temperatura superficial durante febrero, resultados que parecen indicar la activación de mecanismos termorregulatorios de liberación de calor, en los que pudiera también estar involucrada la testosterona a través de sus efectos anabólicos y vasodilatadores, necesarios para la mejor adaptación de los carneros a las condiciones ambientales.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, A., Ayadi, M., Alhidary, I., Alowaimer, A., Abouheif, M. (2016). The relationships between body fatness, leptin, testosterone, and reproductive performance in ram lambs as affected by level and frequency of feeding. *Theriogenology*, 89, 79-85.
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man: A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science*, 148, 1427–1432.
- Bovet, J., Oertly, E. (1974). Free-running circadian activity rhythms in free-living beaver (*Castor canadensis*). *Journal of comparative physiology*, 92, 1–10.
- Bueno, C., Wey, D. (2012). Gênese e ontogênese do ritmo de sono/ vigília em humanos. *Revista da Biologia*, 9,62-67.
- Clarke, S., Clarke, L., Rao, A., Cowley, M., Henry, B. (2012) Sex Differences in the Metabolic Effects of Testosterone in Sheep. *Endocrinology*, 153, 123–131.
- De, K., Kumar, D., Kumar, V., Naqvi, S. (2017). Study of circadian rhythmicity of physiological response and skin temperature of sheep during summer and winter in semi-arid tropical environment. *Physiology & Behavior*, 169, 16-21.
- D'Occhio, M., Brooks, D. (1983). Seasonal changes in the plasma testosterone profile in Merino rams. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 23, 254 – 258.
- Escames, G., Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonina, análogos sintéticos y el ritmo sueño/vigilia. *Revisión en Neurociencia*, 48, 245-254.
- Forsberg, M. (2002) Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En: Ungerfeld (Ed.), Reproducción en los animales domésticos, Montevideo, Melibea – Rodolfo Ungerfeld, pp 125-140.
- Fulkerson, W., Tang, B. (1979). Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep. *Journal of Endocrinology*, 81, 135-141.
- George, W., Godfrey, W., Ketring, R., Vinson, M., Willard, S. (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, 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). *Journal of Thermal Biology*, 92, 102677.
- 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, 733–744.

- Kalyesubula, M., Casey, T., Reicher, N., Sabastian, C., Weinn, Y., Bar Shira, E., Hoang, N., George, U., Shamay, A., Plaut, K., Mabeesh, S. (2021). Physiological state and photoperiod exposures differentially influence circadian rhythms of body temperature and prolactin and relate to changes in mammary PER1 expression in late pregnant and early lactation dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 200, 106394-106400
- Kumar, P., Challet, E., Kalsbeek, A. (2015). Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 74-88.
- Lefcourt, A., Bitman, J., Kahl, S., Wood, D. (1993). Circadian and Ultradian Rhythms of Peripheral Cortisol Concentrations in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 2607-2612.
- Lincoln, G. (1976). Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing hormone and testosterone in the ram. *Journal of Endocrinology*, 69, 213-226.
- Lincoln G.A., Davidson W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behavior and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49, 267-276.
- Littell, R., Henry, P., Ammerman, C. (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, 76, 1216-1231.
- Lowe, T., Cook, C., Ingram, J., Haris, P. (2001). Impact of climate on thermal rhythm in pastoral sheep. *Physiology&Behavior*, 74, 659 – 664.
- Madrid, J.A., Rol de Lama, M.A. (2006). Cronobiología básica y clínica. Editec@Red, S.L.
- Maloney, S., Meyer, L., Blache, D., Fuller, A. (2013). Energy intake and circadian rhythm of core body temperature in sheep. *PhysiologicalReports*, 1 (5).
- Migliaro, A. (2018). Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo.
- Ortavant, R., Daveau, A., Garnier, D., Pelletier, J. (1982). Diurnal variation in release of LH and testosterone in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64, 347-353.
- Pérez-Clariget, R., Forsberg, M., Rodriguez-Martinez, H. (1998). Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta VeterinariaScandinavica*, 39, 35–47.
- Perumal, P., De, A., Alyethodi, R., Savino, R., Khate, K., Vupru, K., Khan, M. (2021). Daily and seasonal rhythmic secretory pattern of endocrinological profiles in mithun bull. *Theriogenology*, 166, 46-54.
- Piccione, G., Arcigli, A., Costa, A., Fazio, F., Caola, G. (2003). El ritmo circadiano de algunos metabolitos azoados en el caballo de saltos. *MedicinaVeterinaria*, 20, 50-54.
- Piccione, G., Caola, G., Refinetti, R. (2002). Effect of shearing on the core body temperature of three breeds of Mediterranean sheep. *Small Ruminant Research*, 46, 211-215.

- Piccione, G., Refinetti, R. (2003). Thermal chronobiology of domestic animals. *Frontiers in Bioscience*, 8, 258–264.
- Pinto-Santini, L., Pérez-Clariget, R., Ungerfeld, R. (2021). Daily variation of the cortisol and insulin concentration, glycemia, surface temperature, and behavior patterns due to the administration of equine Chorionic Gonadotropin in rams. *Domestic Animal Endocrinology*, 78, 106688.
- 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 Raton: CRC.
- Refinetti, R. (2020). Circadian rhythmicity of body temperature and metabolism. *Temperature*, 7, 321-362.
- Reyes, J., Herrera, M., Marquina, J., D`Enjoy, D., Pinto-Santini, L. (2018) Ambiente físico y respuestas fisiológicas de ovinos bajo sombra en horas de máxima radiación. *Archivos de Zootecnia*, 67, 318-323.
- Roenneberg, T., Merrow, M. (1998). Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *Journal of Biological Rhythms*, 13, 167-179.
- Sabater Gárrix, 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.
- Someren, V. (2011). *Handbook of the Biology of Aging* (7^a ed.). Cambridge: Academic Press.
- Ungerfeld, R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaaf rams. *Animal Production Science*, 52, 1036-1041.
- 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.
- Vaidya, M., Kumar, P., Singh, S. (2010). Effect of temperature humidity index and heat load on physiological parameters of Murrah buffaloes and Karan fries cattle during different seasons. *Wayamba Journal of Animal Science*, 578, 2012.
- Vasconcelos, J., Sangsritavong, S., Tsai, S., Wiltbank, M. (2003) Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, 60, 795–807.
- Webb, I.C., Antle, M.C., Mistlberger, R.E. (2014). Regulation of circadian rhythms in mammals by behavioral arousal. *Behavioral Neuroscience*, 128, 304–325.
- Wyse, C., Zhang, X., McLaughlin, M., Biello, S., Hough, D., Bellingham, M., Curtis, A., Robinson, J., Evans, N. (2018). Circadian rhythms of melatonin and behaviour in juvenile sheep in field conditions: Effects of photoperiod, environment and weaning. *Physiology & Behavior*, 194, 362-370.