



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

PATRÓN DE VARIACIÓN DIARIO DE LA SECRECIÓN DE CORTISOL, DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y DEL COMPORTAMIENTO EN OVINOS

Influencia de la fase del ciclo estral, la administración de eCG y el momento del año

Livia Pinto-Santini

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Uruguay

2023

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PATRÓN DE VARIACIÓN DIARIO DE LA SECRECIÓN DE CORTISOL, DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO Y DEL COMPORTAMIENTO EN OVINOS**

Influencia de la fase del ciclo estral, la administración de eCG y el momento del año

Livia Pinto-Santini

Rodolfo Ungerfeld, Ph.D.

Director de Tesis

Raquel Pérez-Clariget, Ph.D.

Co - Directora de Tesis

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Alejandro Bielli

Facultad de Veterinaria – Universidad de la Republica, Uruguay

Dr. Sergio Recabarren

Facultad de Veterinaria – Universidad de Concepción, Chile

Dra. Isabel Vazquez

Facultad de Veterinaria – Universidad de la Republica, Uruguay

ACTA DE DEFENSA



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: PRODUCCIÓN ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: AULA 102, FVET, 14/06/2023

TRIBUNAL: ALEJANDRO BIELLI, SERGIO RECABARREN, ISABEL VAZQUEZ

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
6347964-2	PINTO SANTINI, LIVIA VARENA	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

ALEJANDRO BIELLI

Sergio Recabarren

ISABEL VÁZQUEZ

Esta tesis es dedicada a Madeline y Javier

AGRADECIMIENTOS

Inicio con mi agradecimiento sincero a Rodolfo Ungerfeld. Sí, casi siempre se inicia por el Tutor, pero es que el profe Rodolfo sin ninguna duda ha sido una persona fundamental en esta etapa de mi vida pues, a parte de su rol docente, es una persona generosa, que tiende la mano y se compromete para que las cosas avancen, mostrando el camino para el crecimiento humano y profesional.

A la profa Raquel Pérez-Clariget, quien, a pesar de sus complicaciones personales, siempre esta para dar su aporte y, además, nos ha brindado, a mí y a mis hijos, su amistad.

A todos los tesisistas de grado que participaron arduamente en los trabajos de campo: José Tavío, Yoanlis Jimenez, Octavio Vidal, Gastón Damían, Joaquin Rodriguez, Leandro Méndez, Josefina Mañana, Gabriel Baptista, Bruno Ciccatielo.

Al equipo humano que conforma la Unidad Académica de Fisiología. Desde y con diferentes formas de relacionamiento, todos han sido importantes en este transitar. Destaco el apoyo directo, en trabajos de campo y laboratorio de Madeleine Guerrero, María Jesús Frisch, Juan Carlos Orihuela, Patricia Silvera, Ana María García.

A los compañeros de la Unidad Académica de Ovinos, Lanar y Caprinos, por respetar mis tiempos experimentales y de escritura.

A mis amigos y compañeros de trabajo en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, en especial a: Nelson Martínez, Karin Drescher, Delfin Perez, Jesús Pineda, Isamery Machado, D'endel D'Enjoy, Yudeisy Rondón, Ana Rivero, por todas las vivencias compartidas en el LEFADOT.

Al profesor Antonio Landaeta de la Universidad del Zulia, quien me apoyo en la idea de seguir estudiando en un país en crisis y que, ante las dificultades, me señaló el camino de la migración académica y me presentó al profe Rodolfo.

A mi seno familiar: María Santini, mi madre. Pedro Pinto†, mi padre. Ambos confían y me apoyan en casi todo lo que decido. A mi hermana mayor Delia Pinto Santini, siempre pendiente de mí y de mis andanzas.

A Javier y a Madeline, mis hijos. Si bien los tiempos académicos son diferentes con ellos, también se convierten en grandes aliados y en el caso de Made, hasta ayudante oficial.

A todas las personas que han transitado en mi vida, porque nos sirven de espejo.

Aunque pueda quedar raro, me agradezco a mi misma la fortaleza, la disciplina, el coraje de asumir las cosas del día a día y cumplir los objetivos que me he planteado. Han sido años de mucho aprendizaje. No es fácil migrar, criar, trabajar y estudiar, pero si se puede.

¡Coraje para todas las mujeres que se han atrevido y las que atreverán!

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Esta tesis reúne información generada en cuatro experimentos (Experimento I, II, III y IV), los primeros tres dieron origen, cada uno, a la publicación de un artículo en revistas científicas internacionales. En este documento se presentan los aspectos más destacados de cada publicación. Del cuarto experimento resta completar el análisis de las variables metabólicas y la redacción de su publicación. La discusión general incluye los cuatro experimentos y el aporte que esta Tesis hace al conocimiento actual del tema. Las publicaciones completas se anexan al final de la Tesis de acuerdo al siguiente orden:

I. Pinto-Santini L, Ungerfeld R. The phase of the estrous cycle modifies the endocrine, metabolic and behavior rhythms in ewes *Physiology & Behavior* 204 (2019) 324-335. Anexo I.

II. Pinto-Santini L, Pérez-Clariget R, Ungerfeld R. Does the metabolic and behavior daily variation pattern on rams differ in summer and winter? *Biological Rhythm Research* (2022) DOI: 10.1080/09291016.2022.2129541. Anexo II.

III. Pinto-Santini L, Pérez-Clariget R, Ungerfeld R. Daily variation of the cortisol and insulin concentration, glycemia, surface temperature, and behavior pattern due the administration of equine Chorionic Gonadotropin in rams. *Domestic Animal Endocrinology* 78 (2022) 106688. Anexo III.

ÍNDICE

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES	7
ÍNDICE.....	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	12
1.1. <i>Clasificación de los ritmos biológicos. Definición, características y algunas propiedades de los ritmos circadianos.....</i>	<i>12</i>
1.2. <i>Sistema circadiano. Componentes. Aferencias y eferencias del núcleo supraquiasmático.....</i>	<i>14</i>
1.3. <i>Patrón diario de actividades básicas en los rumiantes.....</i>	<i>19</i>
1.4. <i>Ritmo circadiano de la concentración de cortisol</i>	<i>21</i>
1.5. <i>Ritmo circadiano del metabolismo energético en rumiantes.....</i>	<i>22</i>
1.6. <i>Temperatura corporal. Patrón circadiano. Formas de medir la temperatura corporal en rumiantes</i>	<i>26</i>
1.7. <i>Influencia de los esteroides sexuales en el sistema circadiano en las hembras y en los machos.....</i>	<i>27</i>
1.8. <i>Cambios estacionales de los ovinos.....</i>	<i>33</i>
2. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.....	36
3. HIPÓTESIS.....	38
3.7. <i>Hipótesis general.....</i>	<i>38</i>
3.8. <i>Hipótesis específicas.....</i>	<i>38</i>
4. OBJETIVOS.....	39
4.7. <i>Objetivo general</i>	<i>39</i>

4.8.	<i>Objetivos específicos</i>	39
5.	ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	40
6.	EXPERIMENTOS	42
6.7.	<i>Experimento I</i>	42
6.8.	<i>Experimento II</i>	47
6.9.	<i>Experimento III</i>	54
6.10.	<i>Experimento IV</i>	58
7.	DISCUSIÓN GENERAL	66
8.	CONCLUSIONES	72
9.	REFERENCIAS	73
10.	PUBLICACIONES	85
	Anexo 1	86
	Anexo 2	99
	Anexo 3	120

RESUMEN

Los esteroides sexuales pueden modular el patrón de variación diaria (PVD) de algunas funciones fisiológicas y conductuales de los ovinos. El objetivo de ésta Tesis fue determinar si la fase del ciclo estral de la oveja, el momento del año, la administración de eCG a carneros o testosterona a corderos castrados, modifican el PVD de la concentración de cortisol, metabolismo, temperatura corporal y comportamiento. Durante la fase folicular de las ovejas, la concentración de cortisol fue mayor ($P < 0,01$), y su acrofase se retrasó ~ 5 h ($P < 0,05$) en comparación con la fase luteal (Experimento I). En el Experimento II, con carneros, durante la estación reproductiva (verano) el mesor y la amplitud del PVD de la concentración de cortisol fueron menores ($P = 0,01$, para ambos) y su acrofase tendió ($P = 0,07$) a presentarse más tarde que durante la estación no reproductiva (invierno). La temperatura superficial tuvo un mayor mesor, una menor amplitud y una acrofase más tardía en la estación reproductiva que en la no reproductiva ($P < 0,01$). Además, la acrofase de la relación glucemia:insulina y del tiempo dedicado a dormir se produjeron antes durante la estación reproductiva ($P = 0,001$) que en la no reproductiva. La administración de eCG a los carneros durante el invierno (estación no reproductiva) adelantó la acrofase de la concentración de insulina ($P = 0,04$), del tiempo dedicado a comer ($P = 0,04$) y del tiempo dedicado a dormir ($P < 0,0001$) (Experimento III). No obstante, la administración de testosterona durante el verano (estación reproductiva) en los corderos castrados al nacer solo retrasó la acrofase del tiempo dedicado a comer cuando la testosterona fue administrada en 3 dosis consecutivas, a intervalos de 7 d cada uno ($P=0,03$). Las ovejas son capaces de ajustar en forma rápida el PDV de la concentración de cortisol de acuerdo con los cambios en las concentraciones de los esteroides sexuales del ciclo estral. En los carneros, los cambios en los PDV presentados parecen indicar que los mismos no son modulados directamente por la testosterona, sino por otros mediadores asociados al momento del año. En conclusión, los factores evaluados indujeron pocos cambios en los PVD considerados, demostrando así que algunos patrones evolutivos son rígidos, limitando el efecto de los esteroides sexuales en su patrón basal.

ABSTRACT

Sex steroids can modulate the pattern of daily variation (PDV) of some physiological and behavioral functions in sheep. The objective of this Thesis was to determine if the phase of the estrous cycle in the ewes, the time of the year, and the administration of eCG to rams or administration of testosterone to castrated lambs, modify the PVD of cortisol concentration, metabolism, body temperature, and behavior. During the follicular phase of ewes, the cortisol concentration was greater ($P < 0.01$), and its' acrophase was delayed ~ 5 h ($P < 0.05$) compared to the luteal phase of the estrous cycle (Experiment I). Experiment II was performed with rams during the breeding season (summer), the mesor and the amplitude of the PVD of the cortisol concentration were lower ($P = 0.01$, for both), and its acrophase tended ($P = 0.07$) to present later than during the non-breeding season (winter). In addition, the surface temperature had a greater mesor, a lower amplitude, and a delayed acrophase during the breeding than the non-breeding season ($P < 0.01$). Moreover, the acrophase of the glycemia:insulin ratio and the time spent sleeping were observed earlier during the breeding than in the non-reproductive season ($P = 0.001$). The administration of eCG to rams during winter (non-breeding season) advanced the acrophase of the insulin concentration ($P = 0.04$), the time spent eating ($P = 0.04$), and the time spent sleeping ($P < 0.0001$) (Experiment III). Nevertheless, the administration of testosterone during summer (breeding season) to castrated lambs at birth only delayed the acrophase of the time spent eating when the testosterone was administered for 3 doses consecutively, with intervals of 7 d each ($P = 0.03$). Ewes can quickly adjust the PDV of the cortisol concentration according to the changes of the steroids sexual of the estrous cycle. In rams, the changes presented in the PDV could indicate that testosterone does not modulate them directly, and probably other mediators associated with the moment of the year have greater influence. In conclusion, the evaluated factors induced little changes in the PDV considered, showing that some evolutive patterns are rigid, limiting the sex steroids' sexual effects in their basal pattern.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Diversos procesos fisiológicos y de comportamiento de los seres vivos se presentan en forma rítmica, variando en forma regular en relación al tiempo. La adaptación a la alternancia de día y noche, originado por la rotación de la tierra, es una de las estrategias más conservadas en muchas especies, incluidos los animales de producción, a lo largo de la evolución (Wright et al., 2013). Esto ha permitido la coordinación de las funciones fisiológicas y de comportamiento de los seres vivos con el ambiente local, asegurando que los procesos corporales se produzcan en el momento óptimo utilizando el ciclo luz/oscuridad como referencia sincronizadora.

1.1. *Clasificación de los ritmos biológicos. Definición, características y algunas propiedades de los ritmos circadianos*

Los ritmos biológicos pueden clasificarse según su periodicidad en infradianos (> 24 h; p.e. ciclo estral, ciclos estacionales y/o circanuales), circadianos (\sim cada 24 h; del latín, *circa* (alrededor) y *dies* (días); p.e. secreciones hormonales, temperatura corporal) y ultradianos (< 24 h; p.e. ritmo cardiaco y respiratorio, secreciones neuroendocrinas, motilidad gastrointestinal) (Refinetti, 2016). Sin embargo, para que un ritmo biológico sea considerado circadiano, aparte de su periodicidad, debe ser generado endógenamente (reloj interno, el que genera un tiempo también interno) y modificarse de acuerdo con los ciclos ambientales (tiempo ambiental) (Aschoff, 1979).

En los experimentos para determinar el ritmo circadiano, los datos obtenidos, productos de la observación y/o muestreos seriados, por tratarse de variables rítmicas pueden analizarse ajustándolos a una función cosenoidal. El método estadístico Cosinor permite caracterizar a un ritmo biológico mediante un ajuste por cuadrados mínimos a una función cosenoidal. Las características de la función cosenoidal y que permiten definir el ritmo circadiano son de acuerdo a Refinetti (2016):

- Mesor (acrónimo de “midline estimating statistic of rhythm): Valor medio basado en la

distribución de valores obtenidos en un periodo completo.

- Amplitud: Es una medida del grado de variación dentro de un ciclo definida como la distancia entre el mesor y el valor máximo y/o mínimo, asumiendo que estos son equidistantes. De esta forma, la amplitud se considera como la mitad del rango de oscilación de los datos.
- Fase y acrofase: La fase es el valor instantáneo de una variable biológica en un momento dado. Cuando los datos son ajustados a una curva cosenoidal, el pico o valor máximo de los datos se suaviza y se obtiene un valor máximo de los datos ajustados. La hora del día en que la variable estudiada alcanza su valor máximo es la acrofase.
- Periodo del ritmo: Definida como la longitud del ciclo (~ 24 h; en el caso de los ritmos diarios y los ritmos circadianos). El tiempo entre dos acrofases consecutivas permite establecer el periodo del ritmo.

Además, se puede caracterizar el ritmo en base a su robustez. En el procedimiento de cosinor, la robustez puede calcularse fácilmente como el cociente de la varianza asociada con la función coseno y la varianza total (y luego multiplicarse por 100 para expresarse como porcentaje de la ritmicidad máxima). Aunque la robustez realmente estaría expresando que tanto se ajustan los datos a la función cosenoidal, en algunos casos se ha usado para expresar la fuerza (estacionariedad) y la regularidad del ritmo (Refinetti, 2016).

Las propiedades más importantes de los ritmos circadianos son: a) su periodo en condiciones de curso libre (“free-running” en inglés) y b) la respuesta del ritmo a los impulsos luminosos que pueden arrastrarlo (curva de respuesta de fase) (Gorman y Lee, 2002). En el primer caso, en ausencia de sincronizadores (p.e. oscuridad o iluminación crónica), los ritmos biológicos expresan su componente endógeno, que corresponde al período específico del reloj interno (Golombek, 2007). Para conocer la duración del periodo de un ritmo es necesario identificar algún marcador de fase característico de ese ritmo, p.e., el comienzo o el final de la marcha nocturna en roedores, o el momento en que se presenta la temperatura corporal mínima y/o máxima. El período del ritmo es el tiempo que transcurre entre los mismos marcadores de fase en días sucesivos (Gorman y Lee, 2002) y que, como se mencionó, en condiciones ambientales constantes, son ligeramente diferentes a las 24 h (Refinetti, 2016). Cuando la naturaleza endógena de un ritmo no ha sido comprobada, es preferible usar los términos ritmos diarios y/o patrón de variación diario para describir la ritmicidad de una variable a lo largo del día (incluida el día – fase lumínica y la noche – fase oscura) (Refinetti, 2016).

Muchos estímulos pueden “arrastrar” un ritmo circadiano. Siendo que la luz es la señal más

destacada en la sincronización circadiana, tal como se verá más adelante, los pulsos de luz se han utilizado para generar curvas de respuesta de fase. No obstante, la magnitud del cambio de fase (“arrastre”) depende del momento en que se presenta la señal durante el ciclo. Así, en humanos, por ejemplo, bajo condiciones controladas de laboratorio, la luz que se recibe a partir de los 2/3 del periodo de sueño, o tras el despertar (es decir, al final del periodo de reposo), adelanta el reloj interno e influye en el horario de dormir y despertar del próximo ciclo. Por el contrario, la luz que se percibe cerca del momento de ir a dormir o hasta los 2/3 del sueño (es decir, al final del periodo de vigilia), retrasa el reloj circadiano y el horario de dormir y despertar (revisión: Burgess et al., 2002). Dado que el periodo rara vez es exactamente igual a las 24 h, cada día se produce un ligero desajuste entre el organismo y el entorno. El reloj circadiano se sincroniza con el ciclo externo mediante desplazamientos de fase diarios en los que el desplazamiento es igual a la diferencia entre las 24 h y el periodo real (Refinetti, 2016).

1.2. *Sistema circadiano. Componentes. Aferencias y eferencias del núcleo supraquiasmático*

El sistema circadiano está constituido por los siguientes componentes y sus relaciones: a) los que generan los ritmos: compuestos por un oscilador o reloj central y los relojes periféricos; b) los que sincronizan los ritmos, tanto con el ambiente externo como a nivel interno (tiempo ambiental): compuesto por sincronizadores fóticos y no fóticos (denominadas “zeitgeber” en alemán o “cues” en inglés) y sus respectivas vías de entrada (aferencias) y, c) las vías de salida (eferencias) de información desde los relojes a los sistemas efectores (mecanismo de acoplamiento) (Figura 1). En los mamíferos, el reloj central es el núcleo supraquiasmático (NSQ), una estructura bilateral, compuesta por ~10.000 neuronas (en roedores) y células de la glia, localizada en la región anterior del hipotálamo, a cada lado del tercer ventrículo, directamente sobre el quiasma óptico (Figura 2; revisión: Silver y Rainbow (2013). Además del NSQ, todos los tejidos y órganos poseen su propio oscilador circadiano (osciladores periféricos; Figura 1). Bajo una visión jerárquica, el rol del NSQ como reloj principal del sistema circadiano es la sincronización de otros relojes, tanto a nivel central como a nivel del cuerpo (Silver y Rainbow, 2013). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, los osciladores periféricos pueden desacoplarse del NSQ y comportarse como osciladores autónomos, generando sus propios ritmos circadianos (Silver y Rainbow, 2013). Esta característica apoya la teoría de que el sistema circadiano se comporta como una red resonante y no tanto como un sistema jerárquico, es decir, que los tejidos

periféricos tienen sus propios relojes circadianos autónomos, que median las respuestas metabólicas y se comunican constantemente con el NSQ (Cribbet et al., 2016).

El principal sincronizador del ritmo circadiano es de tipo fótico. La percepción del ciclo luz-oscuridad permite a muchos animales modular sus actividades a lo largo del día (Refinetti, 2016). La principal vía de aferencia para la información fótica es el tracto retinohipotalámico, que lleva la información lumínica directamente al NSQ, y que es sincronizado por el ciclo luz:oscuridad. Los estímulos no fóticos, como la temperatura ambiental, la disponibilidad de alimentos, presencia de predadores, actividad física (ejercicio) y el contacto social (incluyendo la presencia/ausencia de parejas sexuales), también sincronizan el reloj central (Refinetti, 2016). Estos estímulos constituyen información “especial” (estado de alerta, aumento de la actividad, mecanismos endocrinos - incluidas hormonas con acción metabólica y/o metabolitos - y neurotransmisores) que permite ajustar la fisiología circadiana (Webb et al., 2014; Buijs et al., 2019; Méndez-Hernández et al., 2020) (Figura 1), favoreciendo la adaptación de los animales a su entorno. Algunos sincronizadores no fóticos pueden ser salida y entrada del sistema circadiano (“zeitnehmers” en alemán). En este contexto, en mamíferos, los principales esteroides sexuales, estradiol, progesterona y testosterona, podrían modular algunos ritmos circadianos, pues como se verá más adelante, además de su rol reproductivo presentan también un rol metabólico. La presencia de receptores de estrógenos y testosterona en el NSQ es consistente con la acción aferente de los esteroides sexuales en el funcionamiento del sistema circadiano (Yan y Silver, 2016). La Figura 3 muestra información más detallada relacionada con las aferencias del NSQ (entradas fóticas y no fóticas).

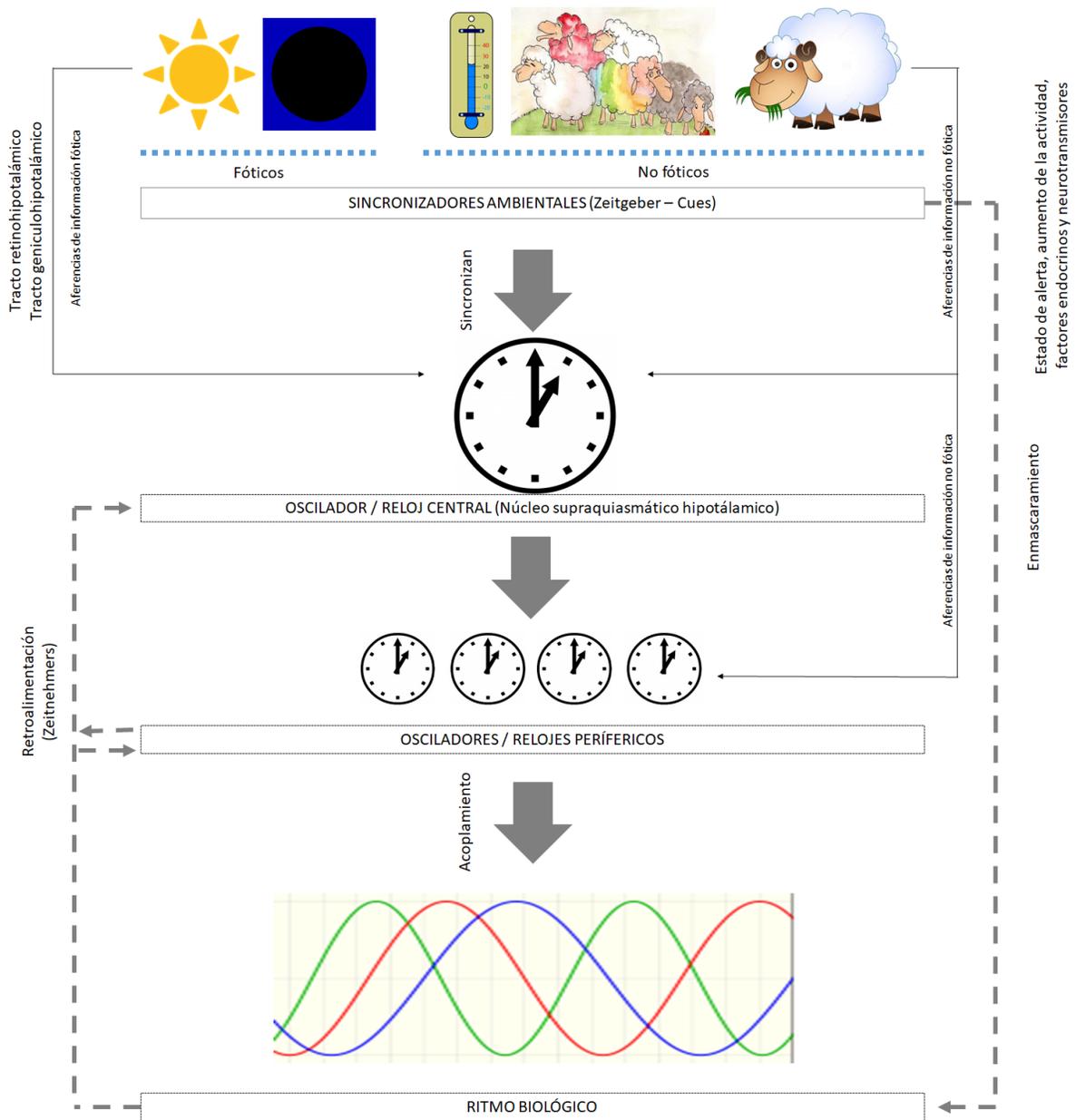


Figura 1. Principales componentes y relaciones del sistema circadiano. Modificado de Golombek (2007) y Refinetti (2016).

Se muestra el mecanismo de sincronización entre los sincronizadores ambientales y el reloj central – núcleo supraquiasmático (y sus principales aferencias) y, el mecanismo de acoplamiento entre los relojes biológicos y los ritmos que controlan. El modelo, aunque bastante simplificado, se complica por la presencia de relaciones directas entre los sincronizadores y los ritmos (enmascaramiento), sin pasar por el ajuste del reloj, y por los mecanismos de retroalimentación entre los ritmos circadianos y los relojes (Golombek, 2007), esto último significa que algunos ritmos podrían también modular las entradas sincronizadoras, lo que ha permitido definirlos como salidas y entradas al sistema circadiano (zeitnehmers, del alemán “tomador del tiempo”). Estos mecanismos de retroalimentación mantienen la integridad y la coordinación temporal entre los diversos componentes del sistema del reloj circadiano (revisión: Cagampang y Bruce, 2012).

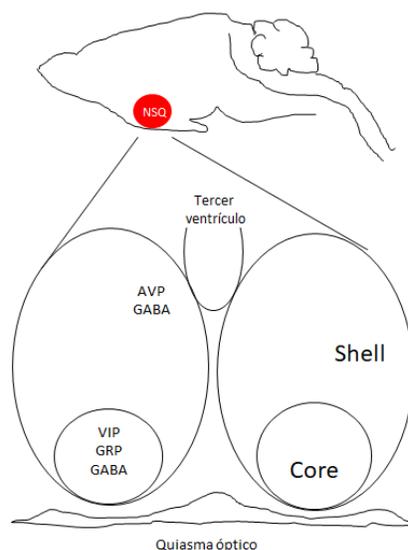


Figura 2. Corte sagital del cerebro de un roedor mostrando la región aproximada de ubicación del núcleo supraquiasmático (NSQ) en el hipotálamo anterior. Modificado de Silver y Rainbow (2013).

Se muestra un esquema ampliado del NSQ donde se puede apreciar la región ventrolateral (core) y la región dorsomedial del núcleo (shell). Las regiones ventrolateral y dorsomedial del núcleo pueden distinguirse por el contenido neuroquímico de sus células, principalmente polipéptido intestinal vasoactivo (VIP por sus siglas en inglés: vasoactive intestinal peptide) y péptido liberador de gastrina (GRP por sus siglas en inglés: gastrin-releasing peptide) en el primero, y arginina vasopresina (AVP por sus siglas en inglés: arginine vasopressin), en el segundo. Todos estos péptidos colocalizan con el ácido gamma aminobutírico (GABA). Las neuronas ventrolaterales responden a la luz y transmiten el mensaje fótico a la porción dorsal de los núcleos (Golombek y Rosenstein, 2010; Silver y Rainbow, 2013; Varadarajan et al., 2018).

Las eferencias del NSQ pueden observarse en la Figura 4. Las eferencias incluyen vías difusibles, humorales (glucocorticoides y melatonina, ambas bien caracterizadas) y neurales. El NSQ secreta vasopresina (AVP), factor de crecimiento transformante (TGFa), procinetina-2 (PK2), entre otros, directamente al líquido cefalorraquídeo y forman parte de las vías difusibles. La AVP ha sido implicada en la ritmicidad de la temperatura corporal (Schwartz y Reppert, 1985; Cheng et al., 2002) y la procinetina-2, con el ciclo sueño/vigilia (PK2) (Cheng et al., 2002). Gilbert y Davis (2009) propusieron que el TGFa funciona como una señal circadiana de salida para la regulación de los ritmos de actividad locomotora en roedores nocturnos, ya que cuando se infunde en el tercer ventrículo inhibe reversiblemente la actividad locomotora y altera el ciclo sueño-vigilia (Kramer et al., 2001). Las vías neurales incluyen proyecciones del NSQ al diencefalo (hipotálamo y tálamo), cuyos principales neurotransmisores son el GABA y el glutamato. Fuera del cerebro, el sistema nervioso autónomo –

SNA (tanto simpático como parasimpático) tiene un importante rol en la comunicación entre el NSQ, a través de conexiones multisinápticas, y los relojes celulares periféricos, incluidos los adipocitos, el corazón, el hígado, la glándula adrenal (Kalsbeek et al., 2000; la Fleur et al., 2000; Buijs et al., 2001). Finalmente, los relojes periféricos también reciben señales indirectas de los NSQ, en este caso, mediante la modulación de otros ritmos (zeitnehmers; como también se puede observar en la Figura 1). Por ejemplo, esto incluye la modulación del ciclo de alimentación:ayuno por parte del ciclo actividad:reposo (revisión: Cagampang y Bruce, 2012).

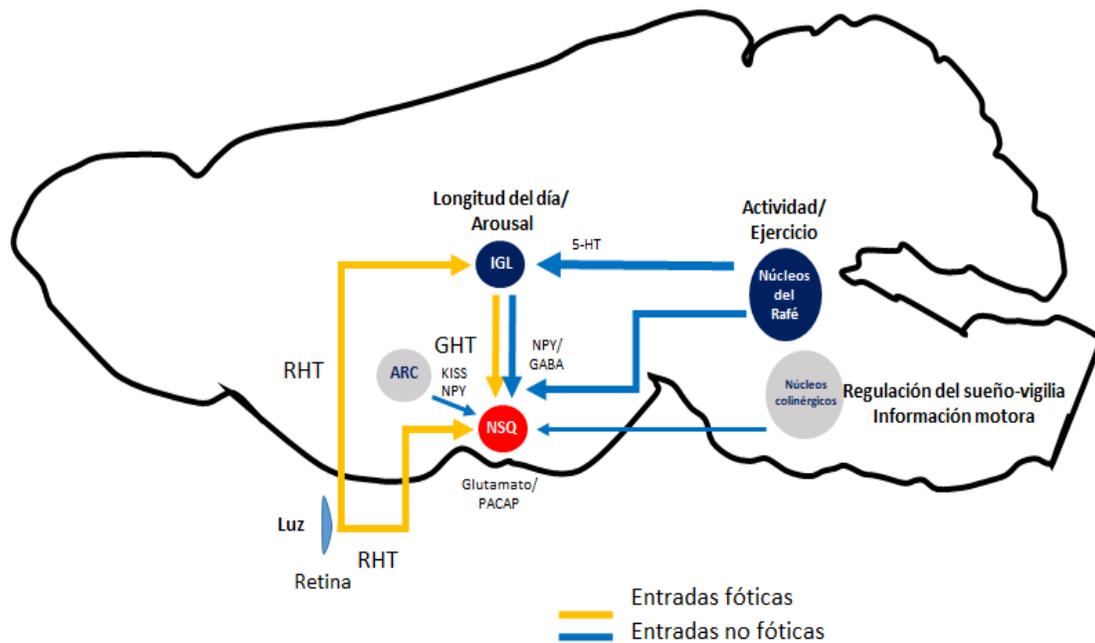


Figura 3. Aferencias del núcleo supraquiasmático (NSQ). Modificado de Silver y Rainbow, 2013.

Las señales sincronizadoras fóticas viajan desde las células ganglionares de la retina hasta la región ventrolateral (core) del NSQ vía las fibras del tracto retinohipotalámico (RHT). Adicionalmente, el RHT proyecta hasta el fascículo intergeniculado (IGL) y el IGL, a su vez, proyecta hacia el NSQ vía el tracto geniculohipotalámico (GTH). De esta forma, el NSQ recibe información de las señales fóticas por dos vías diferentes, una directa, a partir del RHT y una vía indirecta, por GTH. Los neurotransmisores involucrados en estas vías son glutamato y PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (RHT) y el neuropéptido Y (NPY) y el ácido gamma aminobutírico (GABA) (GTH). Finalmente, el NSQ recibe entradas no fóticas de las neuronas serotonérgicas (5-HT) provenientes de los núcleos del Rafé (núcleo dorsal y núcleo medial), los núcleos colinérgicos del tronco cerebral, núcleo arcuato (ARC), cerebro anterior basal, corteza cerebral, hipocampo, áreas noradrenérgicas medulares, éstos últimas no mostradas en el esquema. Algunos neurotransmisores involucrados en las últimas vías mencionadas incluyen también al NPY, GABA y kisspeptina (KISS) (Silver y Rainbow, 2013; Buijs et al., 2017; 2019; Padilla et al., 2019).

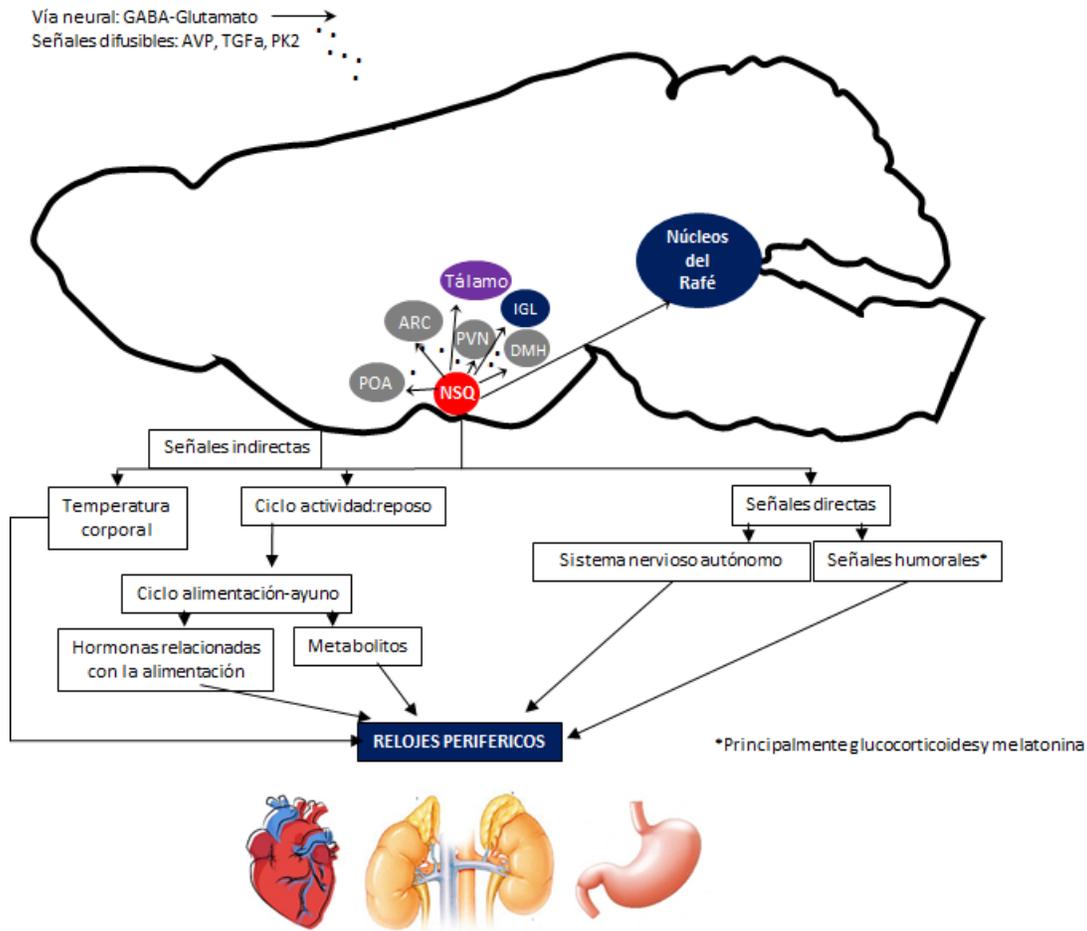


Figura 4. Eferencias del núcleo supraquiasmático (NSQ) (modificado de Silver y Rainbow, 2013).

Áreas y núcleos hipotálamicos. MPOA: área preoptica medial; ARC: núcleo arcuato; NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo; DMH: núcleo dorsol medial del hipotálamo.

IGL: Fascículo intergeniculado.

GABA: ácido gamma aminobutírico; AVP: vasopresina; TGFα: factor de crecimiento transformante; PK2: procinetina-2.

1.3. Patrón diario de las actividades básicas en los rumiantes

Las actividades efectuadas por los animales pueden clasificarse en aquellas que son básicas para la supervivencia, sexuales o reproductivas y maternas. 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. En general, los rumiantes son animales de actividad diurna. Durante las horas de luz, la actividad que insume mayor tiempo es el pastoreo, actividad que es alternada con periodos de rumia y descanso

(Pinto-Santini et al., 2018; Solórzano-Montilla et al., 2018). Los rumiantes pastorean entre 4 a 14 h del día; el tiempo total es determinado principalmente por la calidad y disponibilidad de alimentos y también por el estado fisiológico del animal, que determinan los requerimientos de nutrientes (Parsons et al., 1994; Penning et al., 1995). El pastoreo se produce principalmente al amanecer, por la tarde y al atardecer (revisión: Nikkhah, 2013). En ovinos, en condiciones de clima cálido, Ortêncio et al. (2008) y Pinto-Santini et al. (2018) reportaron un mayor consumo de pasto durante las horas más frescas del día. La selección de la pastura consumida por los ovinos tampoco es uniforme a lo largo del día. En tal sentido, Encinozo-González et al. (2017) reportaron, en ovejas, una mayor preferencia por partes de plantas y/o especies vegetales con mayor contenido de proteína en las horas de la mañana que en la tarde. Resultados similares fueron reportados por Pérez-Ruchel et al. (2017) en borregos en pastoreo, los cuales, ingirieron forrajes menos fibrosos y con mayor contenido de proteína bruta (hojas tiernas) que los borregos estabulados. En vacunos, la velocidad de consumo de las vacas es mayor en las horas de la tarde-noche que en la mañana (Chilibroste, 2002; Rottman et al., 2014). En condiciones de estabulación, la hora de suministro del alimento condiciona su consumo, llegando a observarse durante las mismas a casi la totalidad de las ovejas comiendo (Kieltyka-Kurc et al., 2013). El suministro de alimento en forma restringida durante la fase oscura del día cambia el patrón de actividad de los ovinos, de hábito diurno, demostrando que la conducta de los ovinos puede estar condicionada por el momento en que reciben la alimentación (Piccione et al., 2007). De este modo, se observó que las ovejas alimentadas en la noche reducen su actividad diurna y presentan comportamientos anticipatorios, con un pico de actividad previo a la hora de suministro del alimento.

Los rumiantes requieren rumiar entre 6 y 8 h al día para una adecuada salud ruminal y mejor utilización de la fibra (Dillon y Grigera, 2011; revisión: Nikkhah, 2013). La rumia se efectúa principalmente en posición echada y durante las horas nocturnas (entre las 22:00 h y las 06:00 h) (Gordon y McAllister, 1970; Keskin et al., 2005). Relling y Mattioli (2003) reportaron que el reposo psicosensores, definido como los períodos de descanso y oscuridad, generan un impacto positivo en la rumia de los animales. De acuerdo con Broom y Fraser (2015), las ovejas están despiertas durante aproximadamente 16 h del día. Se presentan siete periodos cortos de sueño; el sueño de ondas lentas ocupa 3,5 h/día y el sueño paradójico o REM (rapid eye movement) ~ 40 min.

Recientemente se ha reportado el ritmo circadiano de algunas actividades en rumiantes usando dispositivos electrónicos para el registro del desplazamiento o acelerómetros. Este tipo de metodología no permite distinguir que actividad está efectuando el animal, pero permite distinguir al

menos cuando está estático o cuando está desplazándose. Con base en ello, Giannetto et al. (2018) reportaron que la acrofase del ritmo circadiano de las actividades efectuadas por ovejas estabuladas se presenta ~ 13:00 h del día, pero la robustez de este ritmo fue baja (< 20%). En vacunos, se han detectado cambios en el patrón de variación de la conducta, medida con sensores de actividad, previo al parto, del estro y a la presentación de sintomatología de problemas podales y mastitis (Wagner et al., 2021). Lo anterior abre un mundo de posibilidades en el tema de la ganadería de precisión donde el seguimiento en tiempo real de las conductas de los animales permite efectuar manejos más individualizados que, posiblemente, favorezcan el bienestar de los animales. Si bien parece haber abundante información sobre el patrón de variación diario de las actividades básicas de los rumiantes, la visión integrada de estas actividades, asociándolas a variables metabólicas y de variación térmica son, al menos en ovinos, escasas.

1.4. Ritmo circadiano de la concentración de cortisol

La secreción de cortisol es regulada por el eje hipotálamo-hipófiso-corteza adrenal. La síntesis de cortisol en la corteza suprarrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) procedente del lóbulo anterior de la hipófisis, que a su vez es estimulada por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) liberada por el NPV del hipotálamo (Greco, 2002). Las concentraciones de cortisol alcanzan sus valores máximos durante las últimas horas de oscuridad y las primeras horas de luz (vacunos: Thun et al., 1981; Lefcourt et al., 1993; ovinos: McMillen et al., 1987; Parraguez et al., 1989), como preparación para la fase activa. Este patrón de variación diario es regulado por el sistema circadiano, ya sea por el control directo ejercido por el NSQ vía núcleo NPV (revisión: Cagampang y Bruce, 2012) o a través de la mediación ejercida por ARC, cuya sensibilidad a las concentraciones de cortisol depende de la hora del día, modulación que también es ejercida por el NSQ (Leon-Mercado et al., 2017). En tal sentido, la comunicación constante del ARC con el NPV permite que este pueda ajustar los niveles de cortisol (Méndez-Hernández et al., 2020). La secreción de cortisol permite a su vez la sincronización de otros relojes periféricos (revisión: Silver y Rainbow, 2013).

A parte del mecanismo fisiológico diario de regulación de los patrones de variación diario de la concentración de cortisol, la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el NPV es desencadenada por diversos estímulos (p.e. agentes estresantes). En este sentido, las mayores concentraciones de cortisol se asocian con situaciones de estrés agudo, siendo un

biomarcador del mismo (Blache y Maloney, 2017). La relación entre el estrés y la reproducción es bastante clara. En general, incrementos de cortisol debido a situaciones estresantes inhibe la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas y de las hormonas folículo estimulante y luteinizante (Ehnert y Moberg, 1991; Tilbrook et al., 1999), afectando, tanto en hembras como en macho, la reproducción. Sin embargo, el cortisol puede jugar un rol importante en la salud reproductiva. El incremento de la secreción de cortisol en el proestro se asocia con la conducta receptiva de la hembra, estimula la secreción de gonadotropinas, facilita la ovulación y reduce los daños causados por la inflamación en roedores y humanos (revisión: Brann y Mahesh, 1991).

Varios factores, como la edad y el peso (cerdos: Hillman et al., 2008), la estación del año (ciervos: Ingram et al., 1999) y la hora de alimentación (terneros: Gardy-Godillot et al., 1989) modifican el patrón circadiano básico de la secreción de cortisol. Además, en algunas especies la fase del ciclo ovulatorio afecta a la percepción de los estresores (roedores: Cavigelli et al., 2005; humanos: Lovick, 2012) y, por tanto, puede interactuar con el patrón circadiano básico del cortisol. En este sentido, debido al aislamiento social, las ovejas al final de la fase luteal presentan una mayor concentración de cortisol que las ovejas en anestro (Freitas-de-Melo et al., 2016). La concentración de cortisol también se ve modificada por la concentración de progesterona, ya que se observan niveles máximos durante la fase folicular en las ovejas (Sosa et al., 2013) y en elefantes hembras (Fanson et al., 2014). En las mujeres, se presenta un retraso en la hora pico del ritmo de cortisol en la fase luteal del ciclo menstrual, en comparación con la fase folicular (Parry et al., 2000). Respecto a los machos, la asociación entre el estatus reproductivo (concentración de testosterona) y los niveles de cortisol no es del todo clara. En general, hasta donde puede conocerse, no hay reportes sobre la modulación que podrían ejercer los esteroides sexuales en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol en los ovinos (hembras y machos).

1.5. Ritmo circadiano del metabolismo energético en rumiantes

La hora del día y el metabolismo son variables estrechamente vinculadas. La mayoría de las variables metabólicas de los animales se caracterizan por presentar variaciones a lo largo del día, entre ellas, la concentración de insulina (Rietema et al., 2015; Niu et al., 2017), cortisol (Selmaoui y Touitou, 2003; Refinetti, 2016) y triyodotironina (Bitman et al., 1990), así como la concentración en sangre de glucosa (Buijs et al., 1993), nitrógeno ureico (Bitman et al., 1990) y ácidos grasos libres

(Alila-Johansson et al., 2006). A continuación, brevemente, se detallará lo que se sabe sobre la ritmicidad circadiana de la glucemia y de la concentración de insulina, por ser las principales variables del metabolismo energético consideradas en esta Tesis.

Glucemia

La glucosa es un metabolito esencial para el funcionamiento celular. Su concentración en sangre es regulada por mecanismos homeostáticos que incluyen a las hormonas insulina y el glucagón. Sin embargo, en situaciones de tensión y/o alerta, la secreción de catecolaminas (acción nerviosa) o cortisol (acción endocrina) actúan como potentes hiperglucemiantes, participando en la homeostasis reactiva de la glucemia (Kuo et al., 2015). La disponibilidad de glucosa condiciona procesos fisiológicos vitales y productivos, tales como la reproducción, la producción de leche y el crecimiento. En rumiantes, la absorción intestinal de glucosa es baja debido a que la mayoría de los carbohidratos fermentan hasta ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen, lo que implica adaptaciones metabólicas y una mayor eficiencia de utilización en comparación con especies no rumiantes (Bondi, 1989; revisión: Huntington et al., 2006). La principal fuente de glucosa en rumiantes es la gluconeogénesis hepática, siendo su sustrato principal el ácido propiónico, que constituye alrededor del 20-35% de los AGV producidos en el rumen (Rottman et al., 2014). En menor medida, los rumiantes recurren a aminoácidos (alanina, glutamina), lactato y glicerol para cubrir las demandas de glucosa (Danfær et al. 1995). En pastoreo continuo, la máxima concentración de AGV y el menor pH del rumen se presenta alrededor de la media noche (vacas lactantes: Taweel et al. 2004). Estos resultados sugieren que la fermentación ruminal es mayor durante las horas nocturnas, rasgo evolutivo que es congruente con el momento del día en que los rumiantes presentan una mayor dedicación a la rumia (Nikkhah, 2013). No obstante, Zhang et al. (2022), reportaron que cuando el alimento es suministrado durante la fase diurna (06:00 h – 18:00 h), la actividad ruminal de las enzimas amilasas, lipasas y celulasas en ovejas es mayor, acompañada de una mayor digestibilidad ruminal de la materia seca, proteína cruda y extracto etéreo que cuando el mismo es suministrado durante la nocturnidad (18:00 h – 06:00 h). En vacas lecheras se produce un incremento en las concentraciones de AGV entre 4-12 h luego del consumo, independientemente de la hora del día (Nikkhah, 2011). Al inicio de la lactancia, el suministro de dietas con altos contenidos amiláceos se asocia con un incremento de la glucemia ~ 2,5 h posconsumo (Eicher et al., 1999).

Si bien el consumo de alimentos, el tipo de dieta (amilácea o fibrosa), la frecuencia de

alimentación y tasa de fermentación ruminal, entre otras, condicionan la absorción de ácido propiónico por las paredes ruminales y, por lo tanto, su flujo hepático, probablemente la variación circadiana de la glucemia pueda, como en el caso de otras especies, ser regulada directamente por el NSQ (Méndez-Hernández et al., 2020). En roedores, al inicio de la fase de actividad, el NSQ envía proyecciones al NPV y al SNA (simpático), para incrementar la producción de glucosa hepática (Buijs et al., 1993; Kalsbeek et al., 2004). Además, el núcleo arcuato (ARC), cuya sensibilidad a la glucemia depende de la hora del día (bajo control del NSQ), informa, por un mecanismo de retroalimentación, sobre la concentración de glucosa disponible al NSQ (Méndez-Hernández et al., 2020). El incremento de la glucemia al amanecer, descrita principalmente en humanos sanos, también podría relacionarse con la acción hiperglucémica del pico de cortisol matutino y con el aumento nocturno de la concentración de la hormona de crecimiento (Bolli et al., 1984). La condición de ayuno en rumiantes, debido a su fisiología digestiva y a su metabolismo intermediario, parecería no ser compatible con la expresión de un patrón de variación diario de la glucemia. Lo anterior, no descarta que la capacidad de producción de glucosa hepática pueda ser, también en estas especies, modulada por el NSQ. Además, como ya fue mencionado, en los rumiantes, la acrofase de la concentración de cortisol también se presenta a primeras horas del día, por lo que también podría generar incrementos de la glucemia debido a la acción hiperglucemiante del cortisol. Además, los efectos antagónicos entre el cortisol y la insulina [ovejas: Bassett et al., 1966; Bassett y Wallace, 1967; humanos: Kamba et al., 2016] podrían promover cambios en la utilización de la glucosa disponible a lo largo del día, incluso en rumiantes. Ajustar los horarios de alimentación acorde con los ritmos endógenos, tratando de sincronizar el oscilador central y los osciladores periféricos, podría ser de interés para mejorar la eficiencia productiva y el bienestar de los rumiantes.

Insulina

La insulina es una hormona proteica que es producida en las células beta de los islotes pancreáticos. En general, esta hormona tiene una función hipoglucemiante, facilitando la captación de glucosa de múltiples tejidos dependientes de insulina. La insulina promueve la lipogénesis y la glucogenogénesis e inhibe la glucogenolisis. A nivel hepático, reduce la gluconeogénesis (revisión: Chan et al., 2022).

El principal estímulo fisiológico para la secreción de insulina en humanos y animales es la ingesta de alimentos, pero la magnitud de la respuesta de la insulina tras la ingesta de alimentos

depende de la hora del día (ratas: Kalsbeek y Strubbe, 1998). En ovejas “calmas” la concentración de insulina y su amplitud fueron mayores que en las “nerviosas”, sin diferencias en la acrofase, que ocurre ~ 15:00 h (Rietema et al., 2015). En vacas lecheras, la concentración de insulina también presenta un claro patrón circadiano, con valores máximos al atardecer (~ 18:00 h) (Lefcourt et al., 1999; Niu et al., 2017). En ambos reportes, la acrofase de la concentración de insulina no se asoció con la frecuencia de alimentación de las vacas ya que las mismas tuvieron una ingesta relativamente constante de nutrientes a lo largo del día, lo que se traduce en tasas de fermentación y absorción de nutrientes relativamente constantes. En tal sentido, ambos grupos de investigación señalan que la acrofase de insulina podría estar relacionada con demandas metabólicas auxiliares u otros mecanismos circadianos como el comportamiento (p.e. el menor consumo de alimentos nocturno; Lefcourt et al., 1999; Niu et al., 2017). Contrariamente, la menor secreción de insulina al final del periodo de descanso podría estar asociada a mecanismos inhibidores del NSQ que operan sobre la entrada parasimpática del estómago, intestino, páncreas e hígado y que impiden el aumento de insulina en esa fase del día, como ha sido reportado en otras especies (Kalsbeek y Strubbe, 1998).

La utilización de la glucosa sanguínea también está condicionada por la captación de los tejidos, como se había mencionado previamente, ya sea que este se efectúe a través de transportadores de glucosa dependiente o no de insulina (Komatsu et al., 2005). Lo anterior también se relaciona con los cambios en la sensibilidad a la insulina durante el día. En humanos, la sensibilidad a la insulina alcanza su máximo (acrofase) hacia el mediodía, siendo un 54% mayor que durante la medianoche (Carrasco-Benso et al., 2016). Este mecanismo evolutivo se asocia con la necesidad de almacenar energía para los periodos de descanso nocturnos (ayuno durante el sueño) y también con los mayores requerimientos de glucosa durante las fases activas del día.

A pesar de que se considera a los rumiantes como menos sensibles a la insulina que los no rumiantes (Janes et al., 1985), la concentración de insulina también es de gran importancia para la homeostasis de la glucosa y para la distribución de nutrientes a los diferentes tejidos. Un ejemplo de ello es el inicio de la lactancia de la vaca, momento en el que la menor sensibilidad a la insulina facilita la absorción de glucosa por la glándula mamaria la cual es independiente de la insulina (Sano et al., 1993). Aunque la mayor sensibilidad a la insulina durante el día posiblemente se asocie con su acrofase, hasta donde pudo conocerse, no hay reportes sobre su patrón de variación diario en ovinos. La relación glucemia:insulina, de relativa fácil medición, podría ser un buen estimador del patrón de variación diario de la sensibilidad a la insulina en los ovinos. En tal sentido, el momento en que se

presenta la mayor relación glucemia:insulina podría asociarse con el momento de menor sensibilidad a la insulina.

1.6. Temperatura corporal. Patrón circadiano. Formas de medir la temperatura corporal en rumiantes

La regulación homeostática de la temperatura es fundamental en el equilibrio interno de los animales endotermos. La termorregulación abarca la integración de diversos sistemas biológicos (respiratorio, digestivo, cardiovascular, motor; Piccione y Refinetti, 2003). Además, desde el punto de vista metabólico, la termogénesis adaptativa conlleva un gasto energético a considerar en condiciones extremas, fuera de la zona de bienestar térmico (revisión: Roland et al., 2016). Adicionalmente, la temperatura corporal presenta ritmicidad circadiana, siendo una de las variables fisiológicas rítmicas más estudiadas tanto en humanos (Aschoff et al., 1967; Kräuchi, 2002), como animales de laboratorio (Castillo et al., 2005) y de producción [ovejas (Recabarren et al., 1987; Lowe et al., 2001; Piccione et al., 2002a; Maloney et al., 2013), cabras (Jessen y Kuhnen, 1996; Kalyesubula et al., 2021), vacas (Lefcourt et al., 1999; Piccione y Refinetti, 2003; Kendall et al., 2008), y caballos (Piccione et al., 2002b)]. El control circadiano de la temperatura depende tanto del NSQ (Refinetti et al., 1994) como del ARC (Méndez-Hernández et al., 2020), los cuales proyectan al área preóptica, responsable de la termorregulación. En animales endotermos, la regulación homeostática y el patrón circadiano de la temperatura corporal parecieran estar en conflicto constante, el primero evitando la oscilación diaria y el segundo promoviéndola. Al respecto, Refinetti (2020) propone que, en el patrón de variación diario de la temperatura corporal, el sistema circadiano estaría modulando el punto de ajuste termorregulatorio de acuerdo a la hora del día pero que, la amplitud del ritmo podría tener control homeostático.

En general, las variaciones circadianas de la temperatura corporal de los animales de producción, como el resto de los animales de actividad diurna, se corresponden con los ciclos de luz: oscuridad, con valores máximos al final de la tarde y valores mínimos antes del amanecer (Piccione et al., 2019). En ovejas ovariectomizadas, Maloney et al. (2013) reportaron amplitudes del patrón de variación diario de la temperatura corporal entre 0,1 y 0,8 °C, de acuerdo al consumo de energía (mayor amplitud y mayor robustez del ritmo cuando el consumo energético fue menor), sugiriendo que la modulación del ritmo circadiano de la temperatura podría ser una respuesta adaptativa de los

animales a los desbalances energéticos (Maloney et al., 2013).

Recientemente se ha reportado la relación entre heterotermia y éxito reproductivo en mamíferos endotérmicos. En roedores silvestres (*Tamias striatus*), la mayor supervivencia y éxito reproductivo se asocian con una menor amplitud en el ritmo diario de la temperatura corporal (Dammhahn et al., 2017). En conejos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) se reportaron resultados similares (Maloney et al., 2017). Adicionalmente, en las hembras, la etapa del ciclo estral modifica aspectos fisiológicos y de conducta, incluyendo el ritmo circadiano de la temperatura. Por ejemplo, en la vaca hay un aumento de la temperatura corporal alrededor del estro (Piccione y Refinetti, 2003). Similares resultados fueron reportados en ovejas, donde la temperatura rectal y la superficial se incrementa durante el estro y ovulación (Barros de Freitas et al., 2018).

La medición de la temperatura corporal como indicador biológico en ovinos, a pesar de su relativa facilidad de medición, ha sido cuestionada debido a la necesidad de capturar y sujetar a los animales para su determinación, la cual puede provocar su rápido incremento (Maloney et al., 2017). La utilización de cámaras infrarrojas podría mitigar este efecto, siendo necesaria la determinación de la temperatura superficial con esta herramienta a lo largo del día, así como su variación espacial (heterotermia superficial) en el animal. En ovinos, por la gran variedad de tipos de capas presentes (color, densidad y longitud del pelo y/o fibra lana), la determinación de la temperatura del ojo (córnea) pudiera ser más precisa que otras zonas de la superficie corporal (McManus et al., 2016). Adicionalmente, George et al. (2014) demostraron que la temperatura superficial del ojo está relacionada con la temperatura central del cuerpo, tanto en vacunos como ovinos. Por otra parte, los ritmos superficiales de temperatura que imitan el ritmo de la temperatura corporal pueden mantener ritmos en los osciladores periféricos y pueden desplazar la fase de los relojes periféricos, independientemente del NSQ (revisión: Silver y Rainbow, 2013).

1.7. *Influencia de los esteroides sexuales en el sistema circadiano en las hembras y en los machos*

Como parte de su carácter adaptativo, el sistema circadiano es sexualmente dimorfo (Gorman y Lee, 2002). Las diferencias sexuales del sistema circadiano se han evidenciado a diferentes niveles, desde lo morfológico, incluyendo la ubicación y expresión de los receptores de andrógenos y estrógenos (aferencias; Figura 5), vías de acción (eferencias) del NSQ hacia el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas (incluidos cambios en la expresión rítmica de genes a nivel gonadal) e hipotálamo-

hipofisis-adrenales (revisión: Yan y Silver, 2016). También existen entre los machos y las hembras diferencias comportamentales, metabólicas y de temperatura corporal que pueden influir en el funcionamiento del sistema circadiano. A continuación, se describirán brevemente alguno de los mecanismos involucrados en los diferentes niveles mencionados.

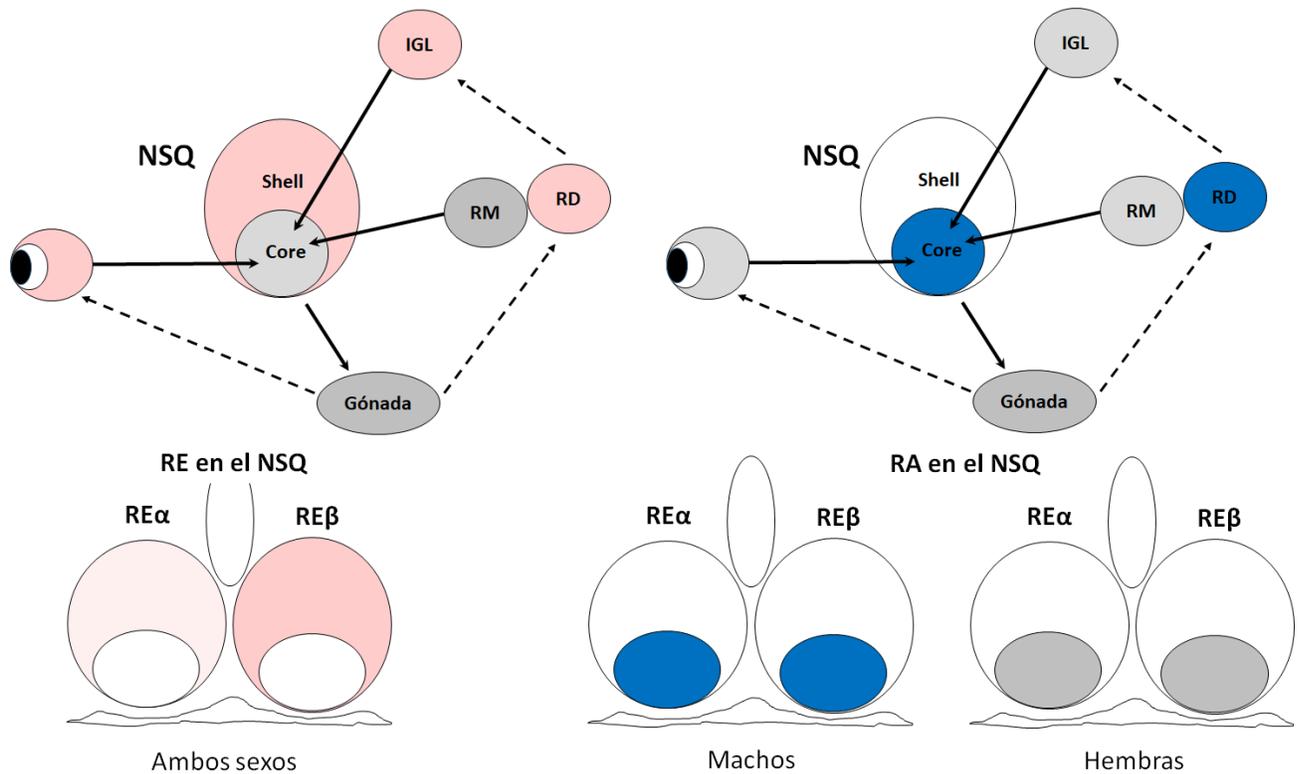


Figura 5. Representación esquemática de las aferencias estrógenas y andrógicas del NSQ y la localización de sus receptores (modificado de: Yan y Silver, 2016).

Se muestra la localización y la abundancia de los receptores de estrógeno (RE; rosado: más intenso, más abundancia) y de los receptores de andrógenos (RA; azul: más intenso, más abundancia). Se han detectado receptores de los esteroides sexuales en la retina, fascículo intergenicular (IGL) y núcleos del Rafé (dorsal – RD y medial - RM). La vía aferente del núcleo del RD hasta el NSQ incluye la proyección desde el núcleo del RM. La expresión de los RE β es mayor que la de los RE α , independientemente del sexo (Vida et al., 2008). Se observa una mayor expresión de los RA en los machos intactos que en las hembras y machos gonactomizados (no mostrado), indicando que la concentración de andrógenos tiene un rol activador en la expresión de sus propios receptores.

Eferencias del NSQ con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

El NSQ envía proyecciones directas al área preóptica medial (neuronas GnRH), al hipotálamo

dorsomedial (neuronas GnIH) y al núcleo anteroventral paraventricular (neuronas de kisspeptina – Kiss1). En roedores hembras, se ha reportado que el pico preovulatorio de LH ocurre en una ventana temporal bastante precisa (Kennaway, 2005), que ha sido vinculada con el tiempo en el que se expresa una mayor abundancia de Kiss1 a nivel central (Kauffman et al., 2007). También, se han reportado proyecciones multisinápticas del SNA directamente al ovario (Yan y Silver, 2016). A nivel gonadal, trabajos efectuados en roedores, reportan la presencia y la ritmicidad de los genes de reloj en las células foliculares y luteales del ovario (Gotlieb et al., 2018), epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal (roedores: Bebas et al., 2009) y testículos (roedores: Gotlieb et al., 2018).

Eferencias del NSQ con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales.

Las diferencias sexuales en la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA) se deben en parte a las diferencias en las hormonas esteroideas gonadales circulantes. En general, la testosterona actúa inhibiendo la función HHA, mientras que el estrógeno estimula la función HHA (Yan y Silver, 2016). Las diferencias sexuales en la activación del eje HHA en estudios con roedores han sido bien establecidas y las hembras, en general, son más reactivas que los machos (revisión: Kudielka y Kirschbaum, 2005). En general, se asume que la progesterona reduce la respuesta de estrés, induciendo estados de calma y relajación (revisión: Freitas-de-Melo y Ungerfeld, 2022). Algunos metabolitos neuroactivos derivados de la progesterona, como la alopregnanolona y la pregnanolona, disminuyen la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central (Barbaccia et al., 2001; Mackenzie y Maguire, 2014). En los roedores, la progesterona o sus metabolitos pueden tener efectos ansiolíticos, sedantes y analgésicos que pueden explicarse por su alta afinidad de unión al receptor del ácido γ -aminobutírico, y por un efecto antagonista de los receptores serotoninérgicos (Valera et al., 1992; Barbaccia et al., 2001). En animales de producción, la administración de progesterona exógena reduce la respuesta de estrés de las ovejas al destete (Freitas-de-Melo et al., 2013). También, se ha reportado concentraciones de cortisol posesquila más elevadas en las ovejas vacías que en las gestantes (Ungerfeld y Freitas-de-Melo, 2019). Al mismo tiempo, las mayores concentraciones de cortisol observadas durante la fase folicular en ovejas (Sosa et al., 2013) y en ratones hembras (Gong et al., 2015) podrían aumentar la percepción a diversos estresores. Además, en mujeres, se ha reportado una coincidencia entre el pico de LH y el pico de cortisol. De un total de 15 mujeres que iniciaron el pico de LH a las 08:00 h, 12 presentaron el máximo valor de cortisol a la misma hora, mientras que las restantes tuvieron el pico de cortisol a las 04:00 h (Kerdelhue et al., 2002). La mayor concentración

de cortisol durante la fase folicular puede modificar el metabolismo energético, promoviendo la movilización de las reservas de carbohidratos (glucogenolisis y gluconeogénesis) (Katsu y Iguchi, 2015).

Respecto a los machos, en general, parece existir un antagonismo entre la secreción de cortisol y la secreción de testosterona, el cual puede explicarse por el efecto inhibitorio que ejerce el cortisol sobre la secreción de GnRH/LH (Tilbrook et al., 2000). En toros (Welsh y Johnson, 1981), chivos (Ungerfeld et al., 2021) y humanos (Sherman et al. 2016), el estrés puede inducir alteraciones en la secreción de testosterona, disminuyendo su secreción o inhibiendo su efecto. No obstante, los efectos de la testosterona en la secreción de cortisol siguen siendo controvertidos. Mientras que el reemplazo de testosterona no afecta la respuesta de cortisol a un desafío de ACTH en carneros castrados (van Lier et al., 2014), la respuesta de cortisol a la hipoglucemia inducida por insulina es mayor en carneros que en las ovejas (Turner et al., 2002).

Diferencias de comportamiento entre las hembras y los machos

A nivel del comportamiento, los cambios dimórficos en los patrones de actividad son diversos. Por ejemplo, en humanos se ha reportado diferencias en el patrón de sueño entre hombres y mujeres (revisión: Mong y Cuscano, 2015). Aunque la fase del sueño cambia a lo largo de la vida, entre los 20 y 50 años de edad, las mujeres tienden a dormir más temprano que los hombres. Este patrón de sueño es consistente con el menor periodo circadiano que ha sido observado en las mujeres (Duffy et al., 2011). Otro ejemplo de los efectos del sexo en la ritmicidad circadiana es el cambio en el inicio del ciclo de actividad de correr en la rueda (wheel-running activity) que se produce durante el estro en roedores de laboratorio. Así, en la noche del pro-estro, las hembras comienzan su actividad circadiana en la rueda antes que en otros días del ciclo estral (Albers, 1981; Wollnik y Turek, 1988). En animales de producción, López-Gatius et al. (2005) reportaron una estrecha relación entre el aumento del tiempo dedicado a caminar y la fertilidad en vacas. En tal sentido, en sistemas intensivos que usan inseminación artificial, el uso de podómetros podría ser una herramienta útil para detectar el celo y predecir la ovulación de las vacas (Roelofs et al., 2005). En general, los cambios en los patrones de variación diario de la conducta de las hembras durante el proestro-estro podrían ser provocados por los elevados niveles de estrógenos de esa fase, lo que es consistente con la presencia de receptores de estrógenos en el NSQ (revisión: Yan y Silver, 2016). Al respecto, en roedores, la magnitud (mesor) de la actividad locomotora podría ser mediada por el receptor de estrógenos- α (Ogawa et al., 2003)

mientras que, su distribución temporal (acrofase) podría ser mediada por el receptor de estrógenos- β (Hatcher et al., 2020).

La concentración de testosterona también puede influir sobre el patrón de actividad de los carneros. En este sentido, los aumentos en la concentración de testosterona estimulan la agresividad (Lincoln y Davidson, 1977) y la exhibición de comportamientos sexuales (Ungerfeld et al., 2018), por lo que los aumentos en la concentración de testosterona podrían modificar el presupuesto de actividades de los carneros, como sucede en ovinos cimarrones (*Ovis canadensis*) (Wang et al., 2018). En ese mismo sentido, Argot et al. (1999) reportaron que los Carneros Soay consumen menos energía metabolizable, probablemente por que dedican menos tiempo a comer, durante la estación reproductiva que, en la no reproductiva. No obstante, hasta donde pudo conocerse, no hay reportes relacionados con los cambios en los patrones de variación diario de la conducta asociados a las concentraciones de esteroides sexuales en la especie.

Diferencias en la temperatura corporal entre las hembras y los machos

Las concentraciones de esteroides pueden modificar la temperatura corporal en las hembras, ya que, por ejemplo, en algunas especies se produce un aumento de la temperatura corporal durante la fase folicular (Mingoas y Ngayam, 2009; Scolari et al., 2011). Además, la ingesta y la digestión de alimentos producen calor, por lo que se podría modificar el comportamiento alimentario durante la fase folicular del ciclo estral. De hecho, el consumo de alimentos disminuye durante el periodo periovulatorio en mujeres, lo que está asociado con las altas concentraciones de cortisol (Fessler, 2003). Durante la fase folicular, la pérdida de calor podría controlarse a través de modificaciones del comportamiento, incluyendo un mayor consumo y excreción de agua, o permanecer más tiempo del día de pie. Además, cuando se modifica la producción de calor, se modifica el flujo sanguíneo en diferentes órganos y partes del cuerpo de los animales por vasoconstricción superficial o vasodilatación.

En roedores se demostró que tanto los estrógenos como la progesterona activan las vías termogénicas en los adipocitos marrones aislados y aumentan los marcadores de biogénesis mitocondrial *in vitro*, mientras que la testosterona ejerce el efecto contrario (Rodríguez-Cuenca et al., 2007). Clarke et al. (2012) reportaron que la testosterona reduce el gasto energético en los machos, por lo que estos presentan una menor temperatura a nivel muscular (músculo esquelético) que las hembras. Debido a que la testosterona afecta la secreción de insulina, como se verá más adelante, y,

por tanto, la absorción de glucosa mediada por la insulina (Harada et al., 2018), es probable que la menor temperatura observada en machos pueda deberse a factores metabólicos. Además, la testosterona también podría modificar la temperatura basal a través de sus efectos vasodilatadores (Jones et al., 2003; Yildiz y Seyrek, 2007), lo que promueve la pérdida de calor. Finalmente, se desconoce si los esteroides sexuales, tanto en la hembra como en el macho, podrían modificar el patrón de variación diario de la temperatura corporal.

Testosterona. Efectos metabólicos y ritmo circadiano

La testosterona, principal esteroide reproductivo masculino, es también una hormona anabólica. Su efecto sobre el metabolismo energético y salud en el macho podría ser mediado por la insulina. De acuerdo a estudios efectuados en roedores (Harada et al., 2018), la testosterona favorece la secreción de insulina de las células beta de los islotes pancreáticos. De esta forma, los ratones castrados mantienen por más tiempo la glucemia elevada que los ratones enteros cuando son sometidos a un desafío con glucosa. Similarmente, en humanos, la menor concentración de testosterona se asocia con mayores concentraciones de glucosa en ayuno (Harada, 2018), resistencia a la insulina y pre-diabetes (Srikanthan y Karlamangla, 2011). Además, la testosterona está implicada en el aumento de la sensibilidad a la insulina en el hipotálamo y en los tejidos hepáticos y musculares; por tanto, tiene un papel crucial en el metabolismo energético y proteico en los machos (Kelly y Jones, 2013). De esta forma, las deficiencias de testosterona incrementan el riesgo de desarrollo de síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en el hombre (Kelly y Jones, 2013).

La secreción de testosterona no tiene un patrón cíclico, como sucede con los esteroides sexuales en la hembra. Su patrón de secreción es pulsátil, aunque también presenta un ritmo circadiano. En los carneros, las concentraciones de testosterona siguen un patrón circadiano, con aumentos durante las primeras horas de la noche - cuando los carneros son menos activos - y concentraciones más bajas entre las 09:00 y las 12:00 h, en el pico de actividad (Lincoln et al., 1977; 1982). En humanos, las mayores concentraciones de testosterona se presentan a primeras horas de la mañana (Miyatake et al., 1980; Tenover et al., 1988). El mecanismo exacto de control de este patrón circadiano no ha sido, hasta donde fue posible conocer, totalmente dilucidado. Sin embargo, seguramente involucra alguna eferencia del NSQ directamente al hipotálamo, como se mencionó anteriormente. También, a nivel testicular, se ha reportado ritmicidad en la expresión de genes de reloj, pudiendo ser otra vía de modulación de la secreción de testosterona. Como ya se mencionó, el

NSQ presenta receptores de andrógenos a nivel de la región ventrolateral (core) (Yan y Silver, 2016). Esto, al igual que pasaría con los receptores de estrógenos, implicaría que la testosterona, además de ser eferente, es un aferente del sistema circadiano. Por tanto, surge la pregunta sobre si el reloj biológico puede “percibir” los cambios en la secreción de testosterona y sincronizar su “tiempo” con base a estos. Las modificaciones metabólicas provocadas por cambios en las concentraciones de testosterona podrían modular al reloj biológico, modificando los ritmos circadianos del metabolismo energético, incluida la secreción de cortisol y la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, en humanos, la vejez conlleva a una reducción de la secreción de testosterona la cual se asocia con desordenes metabólicos y alteraciones en el ritmo de sueño/vigilia (Tenover et al., 1988).

1.8. Cambios estacionales de los ovinos

Estacionalidad reproductiva

Los ovinos son especies con un patrón reproductivo estacional. Su actividad reproductiva se presenta durante los meses de fotoperiodo decreciente (finales del verano a inicios de otoño; Chemineau et al., 2008), aunque con importantes variaciones de acuerdo a la raza y el lugar. En Uruguay, la estacionalidad reproductiva de las hembras ha sido reportada, principalmente en hembras Corriedale y Merilín y en menor grado, en términos de la longitud de la fase de anestro profundo, en hembras Merino e Ideal (Fernández-Abella et al., 1994). En los machos (carneros), las fluctuaciones estacionales en la actividad reproductiva incluyen cambios en la conducta sexual (Lincoln y Davidson, 1977), secreción de testosterona (Pérez-Clariget et al., 1998), espermatogénesis, peso y volumen testicular (Ortavant et al., 1985). En concordancia con la mayor actividad reproductiva de los machos en el otoño (fotoperiodo decreciente), y el tiempo imprescindible para la espermatogénesis, la concentración de testosterona en carneros Corriedale y Merino en Uruguay es máxima desde la mitad del verano hasta inicios del otoño (entre enero y abril) y mínima en invierno y primavera (entre junio y noviembre) (Pérez-Clariget et al., 1998).

Las variaciones estacionales de la actividad reproductiva están determinadas por cambios estacionales de la actividad del eje hipotálamo-hipofisis-gonadal, las cuales son reguladas por la melatonina, principal señal endocrina del ciclo luz:oscuridad. La melatonina se secreta y alcanza su máxima concentración durante la fase oscura, por lo que a medida que se acorta el fotoperiodo y aumentan las horas de oscuridad, aumenta la cantidad de horas en las que la concentración de

melatonina es alta (Goldman et al., 1981). El aumento en la cantidad de las horas en que se secreta melatonina modifica la actividad de las neuronas secretoras de kisspeptina, aumentando la secreción de dicha hormona, y conduciendo a un patrón de secreción de GnRH típico de la estación reproductiva (Chalivoix et al., 2010).

Cambios metabólicos, de conducta y de adaptación térmica asociados a la estacionalidad

Los cambios estacionales en la reproducción se acompañan con modificaciones en la oferta de recursos alimenticios, consumo voluntario, estado metabólico y reservas corporales. Al menos en las regiones templadas, los ovinos aumentan su consumo de alimentos durante la primavera y el verano, aumentando sus concentraciones de glucosa, insulina y acetato en sangre (Chilliard y Bocquier, 2000). Por otro lado, el consumo voluntario disminuye en invierno (Iason et al., 1994), por lo que se produce un aumento de la movilización del tejido adiposo, reflejado en una mayor concentración de ácidos grasos no esterificados (Larsen et al. 1985; Bocquier et al., 1998). Las ovejas expuestas a días cortos presentan menores concentraciones de leptina y prolactina que las que fueron expuestas a días largos. Estos resultados, que fueron independientes de la ingesta de alimentos, condición corporal o actividad gonadal de las ovejas, reflejan una mayor sensibilidad de las ovejas a la privación de alimentos durante la estación reproductiva, cuando el fotoperiodo es descendiente, lo que seguramente afecta su capacidad reproductiva (Bocquier et al., 1998). Contrariamente a lo que ocurre en el invierno, luego de un periodo de privación, la realimentación durante los días largos aumenta la actividad lipogénica de las ovejas. Lo anterior es congruente con la mayor reposición de grasa que ocurre naturalmente en días largos, cuando la oferta de alimento es abundante (Bocquier et al., 1998). Ball et al. (1996) reportaron resultados similares en ovejas, pero no en carneros. La mayor deposición de grasa de los carneros se presenta en el verano, similar a lo que ocurre en las hembras, pero la deposición de músculo estaría ocurriendo más tarde, durante el invierno.

Como se mencionó previamente, prácticamente no hay información sobre el patrón de variación diario de la sensibilidad a la insulina en ovinos. La falta de información incluye, además del posible rol modulador de los esteroides sexuales en la misma, las variaciones estacionales que pudieran presentarse, tanto en la sensibilidad general como en su patrón de variación diario. No obstante, se ha reportado que, en hombres de edad avanzada, la sensibilidad a la insulina es menor en el invierno que en el verano, lo que se asocia con la temperatura ambiental exterior (Berglund et al., 2012). Con relación a otros metabolitos evaluados en la presente Tesis, Piccione et al. (2011) reportan

que las concentraciones de proteínas séricas totales y de albúmina también varían a lo largo del año, con mayores concentraciones en primavera y verano.

La estacionalidad podría asociarse con modificaciones en el patrón de actividades diarias y con adaptaciones térmicas, ya que, durante los momentos de mayor temperatura ambiental, los rumiantes invierten más tiempo en buscar sombra, consumen y rumian menos y dedican menos tiempo a descansar echados (Silanikove 1987; Vizzotto et al. 2015). En condiciones extensivas, Sarout et al. (2018) reportaron que, durante los meses de primavera y verano, las ovejas se presentan activas durante las horas de luz y prácticamente están inactivas durante las horas de oscuridad, pero durante el otoño e invierno, las actividades diurnas presentan varios picos y, durante la oscuridad, los periodos de descanso también se alternan con breves momentos de actividad, aunque de baja intensidad.

Por otro lado, dado que los carneros presentan un patrón estacional en las concentraciones de testosterona, estimular la secreción de testosterona durante la estación en la que ésta se encuentra en menores concentraciones puede constituir un modelo para determinar los efectos de la testosterona en el patrón metabólico y de comportamiento diario. Una alternativa para ello es administrar gonadotrofina coriónica equina (eCG) a los carneros (Ungerfeld et al., 2018).

2. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

La importancia y posibles impactos de la cronobiología – la ciencia que estudia los ritmos y relojes biológicos – han cobrado auge, tanto en la vida cotidiana en general como a nivel de la salud. De hecho, en 2017 el premio Nobel en Medicina fue otorgado a los doctores Jeffrey Hall, Michael Young y Michael Rosbash, pioneros en el descubrimiento del mecanismo de control molecular del reloj biológico de los seres vivos.

De acuerdo a Refinetti (2016), más de la mitad de los estudios reportados en la literatura sobre circadianidad han sido realizados en humanos y los que han sido efectuados en animales fueron principalmente en ratas (43%) y ratones (12%), y solamente el 5% fueron en animales de interés productivo. Incorporar información sobre ritmos circadianos en las prácticas productivas es un enfoque novedoso que pudiera mejorar los resultados productivos, reproductivos y la calidad de los productos (Li et al., 2021), así como aspectos de bienestar en los sistemas de producción con animales. Por ejemplo, ¿se podría mejorar la eficiencia de uso de un alimento concentrado solo con variar su hora de suministro? La hora de ordeño, de los traslados y agrupaciones, ¿se corresponden con el ritmo circadiano de los animales? En la reproducción asistida, ¿el momento del día modifica los resultados de la colecta de semen, de la inseminación y/o trasplante de embriones? ¿La hora de administración de fármacos y/o tratamientos mejora su acción/respuesta? ¿La sensibilidad al dolor, la respuesta a la sedación y anestesia es similar a lo largo del día? Para responder estas preguntas hay que comprender como operan estos ritmos en los animales de producción y los factores que los modulan. También, desde el punto de vista experimental, cotidianamente se efectúan diversas evaluaciones fisiológicas, metabólicas y de conducta en las investigaciones con ovinos. Los resultados de los experimentos pueden verse alterados si dentro del enfoque experimental no se considera el efecto del ritmo circadiano cuando se realizan muestreos, registros, grabaciones u otros. Lo anterior también se aplica al estado reproductivo (concentración de esteroides sexuales; estado fisiológico), ya que tanto el metabolismo como la conducta de los animales puede variar en función de este, incluido, su modulación circadiana.

A pesar de la reducción del stock ovino, la producción ovina continúa siendo un rubro de interés económico y social en Uruguay y forma parte del complejo agro-exportador. Las exportaciones de lana y de carne ovina fueron valoradas en ~ 300 millones de dólares americanos durante el 2021 (SUL,

2022). Considerando la relación mano de obra familiar/mano de obra asalariada, la producción ovina tiene, desde el punto de vista social, una fuerte orientación familiar y una tradición importante para el país. Adicionalmente, la incorporación de pequeños productores intensivos en la zona sur del país, principalmente para la producción de corderos, demanda el desarrollo de nuevas tecnologías y una mayor innovación. Uruguay, además, enfrenta el desafío de producir en forma sostenible, eficiente y con altos estándares de calidad, incluido el tema de bienestar de los animales, por lo que el estudio de los ritmos circadianos puede contribuir con el logro de estos desafíos.

La función fundamental del sistema circadiano es proveer la organización temporal de los procesos fisiológicos y de conducta de los animales para permitir su máxima adaptación. A pesar de que se ha considerado que este sistema opera de forma jerárquica, es decir que el reloj principal (NSQ) percibe la información del “tiempo” y luego la trasmite a los relojes periféricos, cada día hay más evidencias de que su funcionamiento no es autónomo y que también precisa de señales de retroalimentación. Esta Tesis indaga en la modulación que podría ser ejercida por los esteroides sexuales sobre el sistema circadiano (señal no fótica interna). En tal sentido, como puede derivarse de los antecedentes, en el NSQ existen receptores de estrógenos y de testosterona, por lo que ambos esteroides pueden ejercer efectos moduladores de los ritmos biológicos, permitiendo ajustar el patrón de variación diario de aquellas funciones que favorezcan la reproducción. Sin embargo, dichos efectos no han sido dilucidados en especies rumiantes de interés productivo. En los ovinos, la estacionalidad reproductiva, que implica cambios en las concentraciones de esteroides, así como cambios en el fotoperiodo y temperatura ambiente, podrían influir en los patrones de variación diario del metabolismo y la conducta, modificándolos de acuerdo a la estación. La hembra cíclica podría ajustar su ritmo circadiano de acuerdo con la fase del ciclo reproductivo, para facilitar esta función, p.e. cambios conductuales, que favorezcan la proceptividad y la receptividad al macho durante el celo. También, pueden presentar estados de alerta, con o sin modificación de la secreción de cortisol, cambios metabólicos, p.e. en la sensibilidad a la insulina, para garantizar la disponibilidad de nutrientes para la ovulación, fecundación o, estados de reposo-tranquilidad durante la gestación. En los machos, en los que en general la información en el tema es más escasa, los cambios en la concentración de testosterona constituyen un modelo experimental menos complejo para dilucidar algunos aspectos generales relacionados con la modulación que ejercen los esteroides sexuales en el sistema circadiano.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis general

La fase del ciclo estral, el momento del año y la administración de eCG y testosterona modifican los patrones de variación diaria de la concentración de cortisol, el metabolismo, la temperatura y el comportamiento de los ovinos.

Hipótesis específicas

- la fase del ciclo estral (folicular vs luteal) influye en los patrones de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo glucídico, temperatura corporal y comportamiento.
- los patrones de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo glucídico, temperatura corporal y comportamiento durante la estación reproductiva (mayor concentración de testosterona) difieren de los de la estación no reproductiva (menor concentración de testosterona).
- en la estación no reproductiva, el incremento en la concentración de testosterona inducida por la administración de eCG se asocia con cambios en los patrones de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo glucídico, temperatura corporal y comportamiento.
- la administración de testosterona exógena modula el patrón de variación diario del metabolismo glucídico, la temperatura corporal y del comportamiento en corderos castrados en desarrollo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la fase del ciclo estral de la oveja, el momento del año, la administración de eCG a carneros o testosterona a corderos castrados, modifican el patrón de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo, temperatura corporal y comportamiento.

Objetivos específicos

- Comparar el patrón de variación diario de las concentraciones de cortisol e insulina, glucemia, relación glucemia:insulina, temperatura corporal (rectal, vaginal y superficial) y comportamiento en ovejas en fase folicular y fase luteal del ciclo estral.

- Comparar el patrón de variación diario de las concentraciones de testosterona, cortisol, insulina, glucemia, relación glucemia:insulina, concentración de proteína total y albúmina, temperatura superficial y comportamiento en carneros en los meses de agosto (estación no reproductiva) y de febrero (estación reproductiva).

- Comparar el patrón de variación diario de las concentraciones de cortisol e insulina, glucemia, relación glucemia:insulina, temperatura superficial y comportamiento en carneros con y sin administración de eCG durante la estación no-reproductiva.

- Comparar el patrón de variación diario de la temperatura corporal (superficial y rectal) y del comportamiento en corderos castrados al nacer, con o sin reemplazo de testosterona, durante el verano.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Tal como fue mencionado previamente, hay pocos estudios sobre los ritmos circadianos en los animales de producción animal. Esto se ha debido, probablemente, a la dificultad de someter a las especies productivas a condiciones de “curso libre”, bajo condiciones experimentales muy controladas. Sin embargo, entender cómo operan los ritmos biológicos ante desafíos ambientales y endógenos podría ser de interés tanto fisiológico como productivo. Como aproximación experimental, en esta Tesis de doctorado se planteó estudiar el efecto biológico de los esteroides sexuales y el momento del año, que también afectan la concentración de éstos esteroides, sobre el patrón de variación diario del metabolismo energético y del comportamiento en ovinos.

Se realizaron cuatro experimentos. En el Experimento I se sincronizó la fase del ciclo estral de las ovejas con la aplicación de un análogo de prostaglandina-F₂-alfa de modo de obtener hembras en fase folicular (nivel de progesterona bajo; relación estradiol/progesterona alta) y fase luteal del ciclo estral (nivel de progesterona alto; relación estradiol/progesterona baja). Este experimento fue realizado en Venezuela con ovejas West African (raza de pelo), que presentan pocos cambios reproductivos estacionales (de Combellas, 1993), constituyendo un excelente modelo para desafiar la hipótesis general sin el efecto de los cambios en el fotoperiodo presente en las hembras de otras razas y otras latitudes. Además, el experimento fue realizado en la época fresca del año, garantizando la disponibilidad de alimentos, causa fundamental del anestro de estas ovejas (González-Stagnaro, 1984; de Combellas, 1993).

En contraposición, la estación reproductiva de los carneros Corriedale en Uruguay, consecuencia de los cambios de fotoperiodo, se caracteriza por un aumento sostenido en la concentración de testosterona. Además, desde el punto de vista climático, la estación reproductiva coincide con el momento del año en que las temperaturas ambientales son superiores. Por ello, se planteó comparar las diferencias en los patrones de variación diarios del metabolismo y del comportamiento de acuerdo con el momento del año [verano (febrero): estación reproductiva vs. invierno (agosto): estación no-reproductiva] (Experimento II). En este caso, tanto el fotoperiodo (sincronizador fótico), como la temperatura ambiente (sincronizador no fótico externo), así como la concentración de testosterona (sincronizador no fótico interno), estuvieron modulando al sistema circadiano.

Los Experimentos III y IV, tratanto de uniformizar los efectos ambientales externos, se

efectuaron en la estación no reproductiva y reproductiva, respectivamente. Durante la estación no-reproductiva, los carneros de la raza Corriedale presentan concentraciones de testosterona bajas. La administración de eCG, independientemente de la estación del año, causa un incremento de las concentraciones de testosterona en los carneros. Lo anterior permitió contar en simultáneo con carneros con bajas concentraciones de testosterona, debido al momento del año, y carneros con altas concentraciones de testosterona, debido a la administración de eCG (Experimento III). Finalmente, en el Experimento IV, la utilización de corderos castrados al nacer, es decir, no expuestos a testosterona desde el nacimiento, y el posterior reemplazo de testosterona, tanto en forma aguda como crónica, permitió poder dilucidar en forma más precisa si este esteroide podría estar involucrado en la modulación del sistema circadiano de los machos. Para este último experimento, solo se presentan resultados parciales.

En todos los experimentos los animales fueron manejados en condiciones ambientales naturales, en corrales individuales a cielo abierto en los experimentos con machos y bajo techo en el experimento con las hembras, con registro *in situ* de la temperatura ambiental y humedad relativa y de las horas de luz imperantes (momentos de la salida y puesta del sol). Además, los animales fueron alimentados dos veces al día, siempre a las mismas horas (AM: entre las 07:30 y 08:30 h; PM: entre las 15:30 y 16:30 h), tratando de minimizar la sincronización que la hora de alimentación ejerce sobre el sistema circadiano. Respecto a las variables evaluadas, la concentración de cortisol, que también es una hormona metabólica, tiene un rol central en las respuestas de estrés por lo que es de interés poder evaluar como se modula su patrón de variación diario en la especie de acuerdo a los factores considerados. Adicionalmente, considerando que tanto el cortisol como la temperatura corporal pueden ser marcadores de fase del ritmo circadiano en los mamíferos (Gooley, 2016), su incorporación como variables en estudios relacionados con el funcionamiento del sistema circadiano es más que relevante. Con relación a las variables hormonales y metabólicas, si bien se determinó glucemia, concentración de insulina y se calculó la relación glucemia:insulina (indicador de la sensibilidad a la insulina), es decir, principalmente el metabolismo glucídico, también se determinó la concentración sérica de proteínas totales y albumina y, los cambios en la temperatura corporal, todas relacionadas con el metabolismo energético. También se evaluó el patrón de actividad:descanso de los animales y por último, la temperatura superficial medida a nivel del ojo y otras zonas rostrales. Estas regiones constituyen ventanas térmicas que permiten interpretar los flujos sanguíneos y las respuestas termorregulatorias asociadas en animales no esquilados.

6. EXPERIMENTOS

6.1. *Experimento I. Efecto de la fase del ciclo estral sobre el patrón de variación diario del metabolismo energético y comportamiento en ovejas. (Artículo I).*

Objetivos

- Comparar, en ovejas en fase folicular y fase luteal del ciclo estral:
 - el patrón de variación diario de las concentraciones séricas de cortisol, insulina, glucemia y relación glucemia:insulina.
 - el patrón de variación diario de la temperatura corporal (rectal, vaginal y superficial) y de la frecuencia respiratoria.
 - la frecuencia en que las ovejas son observadas efectuando las actividades comiendo, rumiando, paradas, echadas, orinando, defecando, tomando agua y en posición bípeda, durante el día.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en el Laboratorio-Sección de Ovinos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (10°16' N; 67°35' O), durante los meses de febrero y marzo (época fresca en la región; Anexo I) y tuvo una duración de 32 d. Se utilizaron 8 ovejas West African adultas pertenecientes al rebaño experimental (48,3 ± 2,7 kg), con actividad ovárica verificada mediante observación del tracto reproductivo con ultrasonido. Debido a que las ovejas eran rutinariamente manejadas en condiciones de semi-estabulación, con pastoreo diurno (desde las 8:00 a 16:00 h) y confinamiento el resto del día, fueron sometidas a un periodo de acostumbramiento de 21 d a las condiciones experimentales. Durante ese periodo, las ovejas fueron alojadas en corrales individuales, tuvieron contacto con humanos cada día y fueron alimentadas en dos momentos: mañana (entre las 07:30 y 08:30 h) y tarde (entre las 15:30 y 16:30 h). La dieta, de mantenimiento, estuvo compuesta por heno de pasto estrella [*Cynodon nlemfuensis*; 1,7 kg animal⁻¹day⁻¹; ~90% de materia seca (MS) y ~18% de proteína cruda (PC)], alimento concentrado comercial (400 g animal⁻¹day⁻¹;

~88% MS, ~14% PC), cáscara de naranja fresca (600 g animal⁻¹ day⁻¹; ~30% MS; ~6% PC), suplemento mineral (50 g animal⁻¹) y libre acceso a agua *ad libitum*. Para minimizar la reacción negativa durante las determinaciones de temperatura corporal y muestreos sanguíneos, los cuales incluyen captura y sujeción de los animales, las ovejas recibieron estimulación táctil (Chaumont et al., 2021). Brevemente, cada oveja fue cepillada por 5 min día⁻¹ en la región dorsal, en sentido cráneo-caudal, usando un cepillo de cerdas semi-duras de plástico.

Tratamientos experimentales

Las ovejas fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos: a) fase folicular; b) fase luteal. Para ello, el ciclo estral fue sincronizado con cloprostenol, un análogo de prostaglandina-F2-alfa (75 µg mL⁻¹ de cloprostenol IM). Las ovejas fueron divididas al azar en dos grupos de modo que, en el primer periodo de muestreo, la mitad de las ovejas se encontraran en fase folicular y la otra mitad en fase luteal, invirtiéndose esto en el segundo periodo de muestreo, el que se efectuó 10 días después.

La fase del ciclo estral fue confirmada de acuerdo con las concentraciones de progesterona (se consideró que concentraciones ≥ 1 ng mL⁻¹ de progesterona son compatibles con la presencia de un cuerpo lúteo funcional). Cada periodo de muestreo tuvo una duración de 50 h, e incluyó registros de comportamiento (durante las primeras 48 h), de variables fisiológicas (sólo durante las primeras 24 h) y muestreos de sangre para las determinaciones metabólicas y endocrinas (sólo durante las últimas 26 h). El día anterior a cada periodo de muestreo, se insertó un catéter en la vena yugular de cada oveja utilizando anestesia local (1 a 2,5 mL animal⁻¹ de lidocaína al 1%).

Condiciones ambientales

Durante todo el experimento, la temperatura ambiente y la humedad relativa se registraron cada hora con una estación meteorológica portátil colocada *in situ*. El índice de temperatura-humedad (ITH) se calculó según Valtorta y Gallardo (1996). La temperatura ambiental y el ITH durante el día variaron de forma similar, con valores máximos entre 29-31 °C y 76-78 unidades, para temperatura ambiente e ITH, los cuales se presentaron entre de 13:00 h a 15:00 h. La variación diaria entre las temperaturas mínima y máxima fue de ~10 °C. La humedad relativa media diaria superó el 60%. La hora de la salida y puesta del sol fue a las 06:30 h y a las 19:00 h, respectivamente.

Registros de comportamiento

Las actividades realizadas por las ovejas fueron determinadas mediante paneo visual cada 2 h, desde las 09:00 h del primer día hasta las 09:00 h del segundo día de evaluación. En cada paneo se registró el número de ovejas observadas comiendo, rumiando, paradas, echadas, orinando, defecando y tomando agua y en posición bípeda (con las patas delanteras apoyadas en la pared del corral y/o comedero). Estas observaciones se efectuaron evitando que las ovejas registraran la presencia del observador.

Temperatura corporal y frecuencia respiratoria

La frecuencia respiratoria, temperatura rectal, temperatura vaginal y temperatura superficial fueron determinadas con la misma frecuencia que los registros de conducta, pero solo durante el primer día de cada periodo de muestreo y, siempre después de realizar el paneo visual. La frecuencia respiratoria se determinó mediante el conteo de los movimientos del flanco del animal durante 15 s y luego extrapolando este valor a $\text{mov}\cdot\text{min}^{-1}$. Posteriormente, se midió la temperatura vaginal y temperatura rectal, usando un termómetro digital.

La temperatura de la superficie corporal se midió sobre el pelo (piel con pelo) de los animales en diez puntos del cuerpo según Montanholi et al. (2008): 1) región del lomo, 2) grupa, 3) fosa paralumbar, 4) vena nasal 5) vena ocular, 6) frente, 7) región craneal, 8) cuello, 9) miembro anterior y 10) miembro posterior. Las mediciones de temperatura se registraron con un termómetro infrarrojo.

Muestreo de sangre y determinaciones

Las muestras de sangre se empezaron a coleccionar al final de la medición de las variables fisiológicas, comenzando a las 09:00 h del segundo día del período de muestreo, y terminando a las 11:00 h del día siguiente. Las muestras se coleccionaron cada hora de las 06:00 a las 18:00 h, y cada 2 h de las 18:00 a las 06:00 h. La sangre se recogió en tubos sin aditivos y se centrifugó (1500 g durante 10 min), se separó el suero y se almacenó inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las determinaciones hormonales se realizaron con kits comerciales de ELISA (detalles en el Anexo I). La concentración de progesterona se determinó en la muestra coleccionada a las 09:00 h. Las concentraciones de cortisol se determinaron en todas las muestras mientras que, las de insulina se determinaron solo en las muestras coleccionadas a las 02:00, 06:00, 09:00, 13:00, 15:00 y 22:00 h. La glucemia se determinó a través de métodos enzimáticos-espectrofotométricos, usando un kit comercial

en los mismos tiempos en que se determinó el cortisol. Finalmente, se calculó la relación glucemia:insulina en las horas en las que se determinó la concentración de insulina.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se presenta, para los 4 experimentos, al final de esta sección.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes de este experimento.

Las concentraciones séricas de cortisol promedio fueron superiores durante la fase folicular que durante la fase luteal ($30,9 \pm 2,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ vs $24,1 \pm 2,1 \text{ ng.mL}^{-1}$; $P < 0,01$). Además, se observó un atraso en el momento del día en que se produce el valor máximo de la concentración de cortisol; mientras que la acrofase de la concentración de cortisol durante la fase luteal se observó las 05:07, durante la fase folicular se produjo a las $10:00 \pm 0:49 \text{ h}$ ($P < 0,05$) (Figura 5; Figura 6).

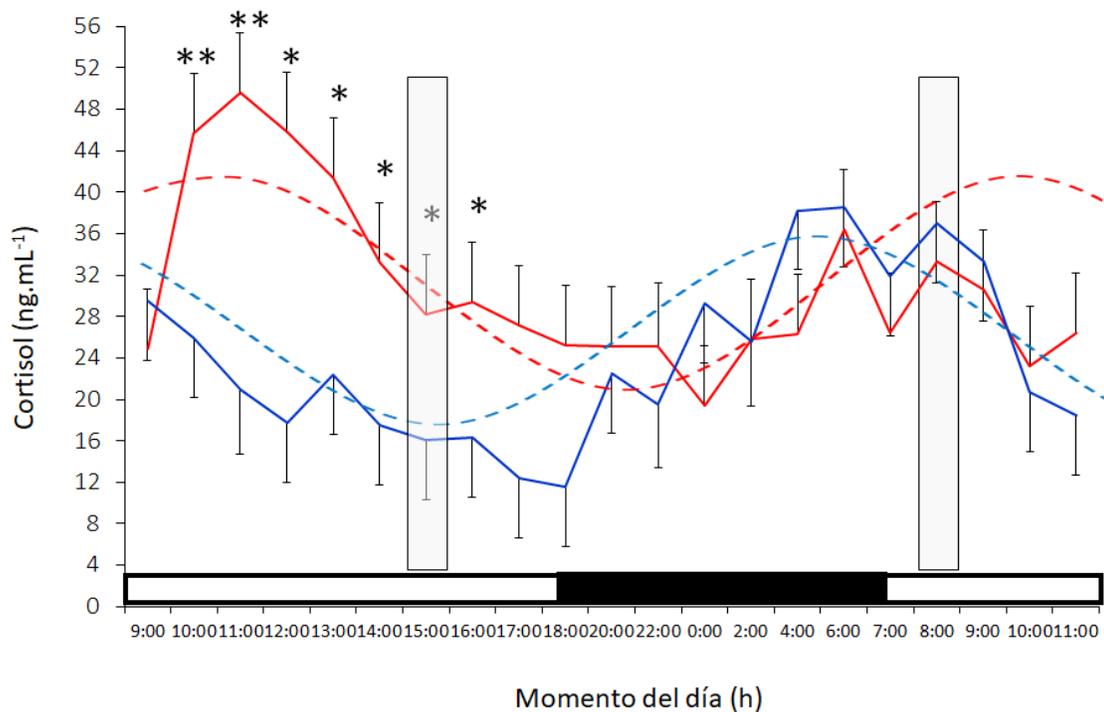


Figura 5. Patrón de variación diario de la concentración de cortisol en ovejas en fase folicular (rojo) y luteal (azul) del ciclo estral.

Las áreas grises indican el momento de suministro de alimento. Las barras blancas y negras indican los periodos

de luz-oscuridad. Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada fase del ciclo estral. *P < 0.05; **P < 0.01 indica diferencias entre las fases del ciclo estral en ese momento del día.

No hubo diferencias en el patrón de variación diario de la glucemia y concentración sérica de insulina. En ambas fases, la acrofase ocurrió ~14:00 h y entre las 17:00h y 18:00 h, respectivamente (Figura 6). La relación glucemia:insulina no presentó ritmicidad, pero tanto la glucemia como la relación glucemia:insulina fueron mayores durante la fase folicular que durante la luteal [(glucemia: $69,9 \pm 1,1 \text{ mg dL}^{-1}$ vs $63,9 \pm 1,1 \text{ mg dL}^{-1}$ (P < 0,01); relación glucemia:insulina: $2,2 \pm 0,2$ vs $1,8 \pm 0,2$ (P = 0,04), respectivamente]. La fase del ciclo estral no afectó la concentración de insulina sérica (folicular: $43,3 \pm 6,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ vs luteal: $44,9 \pm 6,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

La fase del ciclo estral no modificó el patrón diario de la temperatura superficial media ni la rectal. En ambas fases, la acrofase se presentó ~14:30 h y ~17:00 h, respectivamente (Figura 6). Sin embargo, tanto la temperatura rectal como la vaginal, así como las temperaturas superficiales tomadas a nivel de la vena nasal, frente y tabla del cuello fueron superiores durante la fase folicular que durante la fase luteal (P < 0,05). No se detectó ritmicidad para la temperatura vaginal.

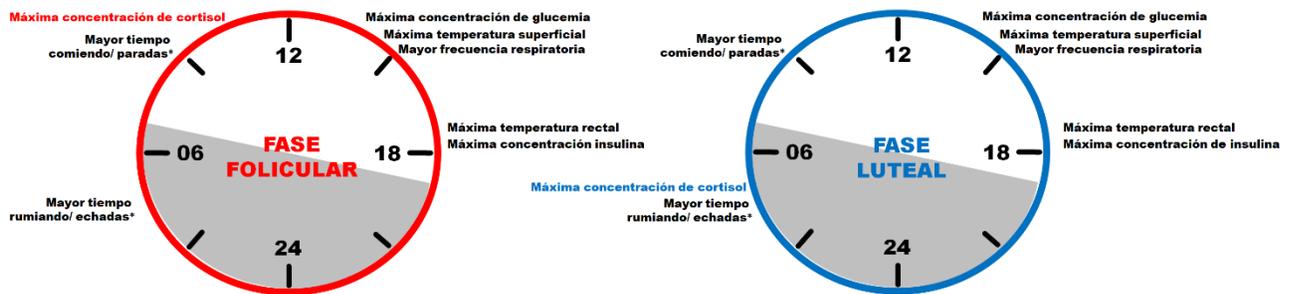


Figura 6. Patrones de variación diario de ovejas en fase folicular y fase luteal del ciclo estral.

Se presentan las horas del día en que se observaron los valores máximos (acrofases) de las variables consideradas. Diferentes colores para una misma variable indican que la acrofase fue diferente de acuerdo a la fase del ciclo estral. Las áreas gris y blanca representan las horas de oscuridad y luz durante la evaluación.

Durante la fase folicular se observó a las ovejas orinando más veces que durante la fase luteal ($7,3 \pm 1,5\%$ vs $1,7 \pm 1,5\%$, respectivamente, P < 0,05). También, durante la fase folicular se observó más veces a las ovejas paradas, bebiendo agua y en posición bípeda, que durante la fase luteal (P = 0,07; P = 0,08 y P = 0,07, respectivamente).

6.2. *Experimento II. Efecto del momento del año sobre los patrones de variación diario de la concentración de testosterona, cortisol y metabolismo energético en carneros. (Artículo II).*

Objetivos

- Comparar en carneros, durante la estación reproductiva (verano) y la estación no reproductiva (invierno), el patrón de variación de:
 - o las concentraciones sanguíneas de testosterona, cortisol, insulina, proteína total y albúmina, glucemia y relación glucemia:insulina.
 - o la temperatura superficial medida a nivel rostral y del ojo.
 - o el porcentaje del tiempo que los animales dedican a comer, rumiar, estar parados, estar echados y dormir.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay; 56°11' O, 34°54' S). Se utilizaron 10 carneros Corriedale adultos [peso corporal: 69,0 + 4,5 kg; condición corporal: 3,5 ± 0,5 (media ± DE); edad: 3-4 años], los cuales fueron evaluados durante los siguientes momentos del año:

- a) la estación reproductiva (verano: enero-febrero): fotoperiodo decreciente, mayores temperaturas ambientales, mayor concentración de testosterona en carneros Corriedale (Pérez- Clariget et al. 1998; Ungerfeld, 2012).
- b) la estación no reproductiva (invierno: agosto-septiembre): fotoperiodo creciente, menores temperaturas ambientales, menores concentración de testosterona en carneros Corriedale.

Los mismos carneros fueron acostumbrados por 21 días, en ambas estaciones, a las condiciones experimentales. Los carneros fueron esquilados 6 meses antes de cada evaluación para asegurar un crecimiento de la lana de 5 a 7 cm de longitud, mantenidos bajo fotoperiodo y temperatura ambiente naturales, y sin presencia de hembras. Durante el día (de 07:00 h a 17:00 h), los carneros fueron alojados en corrales individuales (2,0 m x 1,0 m, situados al aire libre) y, durante la noche (de

17:00 h a 07:00 h), alojados dos corrales colectivos techados con piso de concreto. La alimentación consistió en el suministro de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) ($1,0 \text{ kg.animal}^{-1}.\text{día}^{-1}$; ~85 % de materia seca [MS], ~18 % de proteína cruda [PC]) y alimento concentrado comercial ($250 \text{ g.animal}^{-1}.\text{día}^{-1}$; ~88 % de MS, ~14 % de PC), según sus requerimientos de mantenimiento (NRC 2007), ofrecido en dos momentos del día (en la mañana, entre las 07:30 h - 08:30 h y por la tarde, entre las 15:30 h - 16:30 h), además, tuvieron libre acceso al agua durante todo el día. Como fue descrito en el Experimento I, los carneros recibieron diariamente estimulación táctil.

Condiciones ambientales

En ambas estaciones se registraron la temperatura ambiente y la humedad relativa cada hora, *in situ*, con una estación meteorológica portátil automatizada (altura: 1,2 m). El ITH fue calculado como fue descrito en el Experimento I. En la estación reproductiva, la temperatura ambiente osciló entre 18 °C y 24 °C, la humedad relativa y el ITH se mantuvieron constantes durante el día, con valores entre 40-60 % y entre 60-72 unidades, respectivamente. La hora del amanecer fue a las 06:13 h y la del atardecer a las 19:43 h. En la estación no reproductiva, la temperatura ambiental osciló entre 8,0 °C y 23 °C, la humedad relativa media superó el 80% la mayor parte del día, y el ITH osciló entre 48 unidades y 68 unidades (entre las 12:00 h y las 14:00 h). La hora de la salida y la puesta del sol fueron 07:01 h y 18:27 h.

Registros de comportamiento

La actividad de cada animal (comiendo, rumiando, de pie, echado o durmiendo) se registró cada hora antes de registrar cualquier otro dato. La misma fue reportada como porcentaje del tiempo en las que cada carnero realizó cada actividad, en los siguientes intervalos: de 09:00 a 12:00, de 13:00 a 16:00, de 17:00 a 20:00, de 21:00 a 24:00, de 01:00 a 04:00, 05:00 a 08:00, y 09:00 a 11:00 del día siguiente.

Temperatura superficial

La temperatura superficial, tomada a nivel rostral, se registró cada hora, siempre antes de la colecta de las muestras de sangre. Las imágenes térmicas fueron obtenidas con una cámara digital infrarroja a 1 m y, fueron analizadas utilizando el software FLIR Tools. Las áreas delineadas fueron el ojo (córnea), fosas lagrimales externas (proximal y distal), base de la oreja y nariz. Se reportan los

registros de la temperatura máxima determinada en las áreas mencionadas.

Muestreo de sangre y determinaciones

Las muestras de sangre se tomaron desde las 09:00 h del primer día de evaluación, hasta las 11:00 h del día siguiente (total del período de muestreo: 26 h; total de muestras por carnero 27). La sangre se colectó cada 1 h, siguiendo siempre el mismo orden entre los animales. Cada muestra de sangre (~ 5 mL) se dividió en dos tubos, uno sin aditivos y otro con fluoruro de potasio (para la determinación de la glucemia), y se centrifugó (1500 g durante 20 min) para separar el suero y el plasma, respectivamente. Tanto el suero como el plasma se almacenaron inmediatamente a -20 °C.

Las concentraciones de testosterona y cortisol fueron determinadas por radioinmunoanálisis en fase sólida (RIA; Anexo II). La concentración de testosterona se midió en las muestras colectadas a las 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. La concentración de cortisol se midió en todas las muestras colectadas. La concentración de insulina se midió por un ensayo inmunoradiométrico comercial (IRMA; Anexo II) en las muestras colectadas a las 09:00, 10:00, 12:00, 15:00, 16:00, 17:00, 18:00, 21:00, 22:00, 24:00, 03:00, 06:00, 09:00 y 11:00 h. La glucemia, la concentración de proteínas totales de la sangre y de albúmina se midieron por colorimetría en todas las muestras colectadas. Se calculó la relación glucemia:insulina. En todos los casos se utilizaron kits comerciales.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se presenta, para los 4 experimentos, al final de esta sección.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes de este experimento.

El mesor y la amplitud del patrón de variación diario de la concentración de cortisol fueron menores durante la estación reproductiva ($P = 0,01$ para ambos). No obstante, la acrofase tendió a presentarse más temprano durante la estación no reproductiva (de ~ 2 h; $P = 0,07$) (Figura 7 y 8).

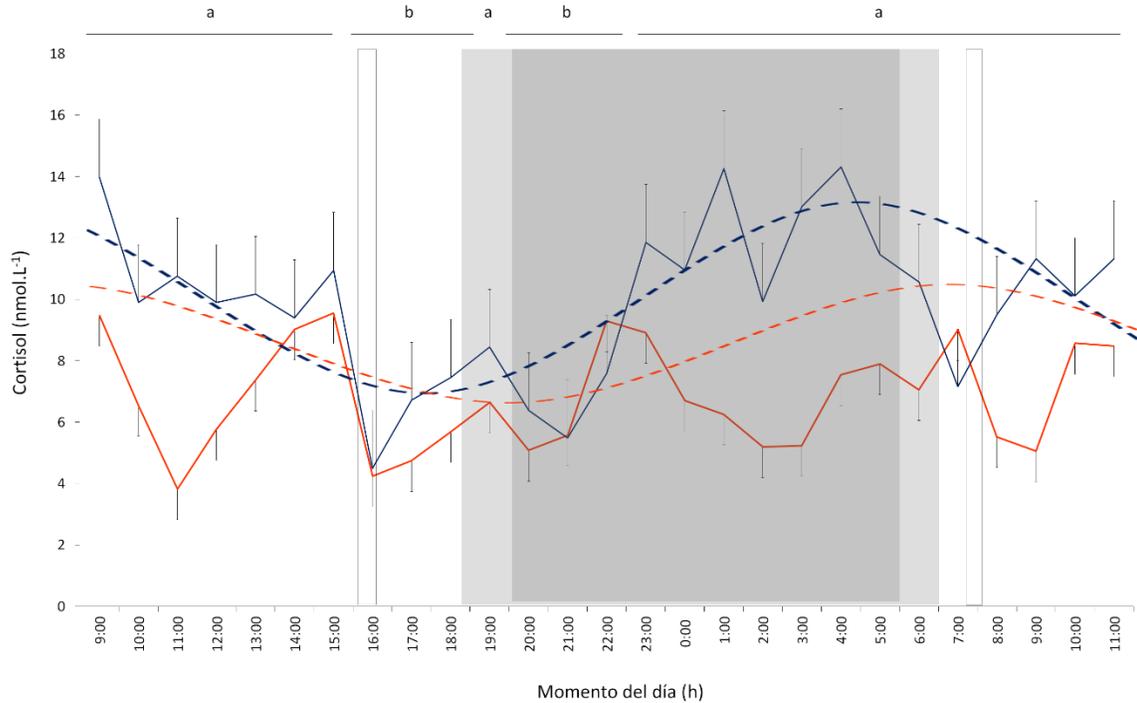


Figura 7. Cambios estacionales en el patrón de variación diario de cortisol en carneros Corriedale. Naranja: estación reproductiva; azul: estación no reproductiva. Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Las áreas grises indican los periodos de oscuridad en cada estación. Las barras verticales indican los momentos de suministro de alimento. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b: $P \leq 0.05$).

La concentración sérica de testosterona y la glucemia fueron mayores ($P < 0,001$) y la de insulina tendió a serlo ($P = 0,06$) durante la estación reproductiva que en la no reproductiva. Sin embargo, los patrones de variación diarios de las tres variables no fueron diferentes entre estaciones (Figura 8). No obstante, la acrofase de la relación glucemia:insulina (Figuras 8 y 9), así como la del tiempo dedicado a dormir (Figura 8 y 10) se produjeron antes durante la estación reproductiva comparado con la no reproductiva ($P = 0,001$). Adicionalmente, durante la estación reproductiva los carneros distribuyeron más uniformemente (menor amplitud) el tiempo dedicado a comer, a estar parados y a estar echados. Las concentraciones de proteína total y albumina fueron mayores en la estación reproductiva que en la no reproductiva ($P < 0,001$; para ambas), pero ninguna presentó un patrón de variación diario claro.



Figura 8. Patrones de variación diario de carneros Corriedale durante la estación reproductiva y la no reproductiva.

Se presentan las horas del día en que se observaron los valores máximos (acrofases) de las variables consideradas. Diferentes colores para una misma variable indican que la acrofase fue diferente de acuerdo a la estación. Las áreas gris y blanca representan las horas de oscuridad y luz durante la evaluación. †Acrofase tiende a ser diferente de acuerdo a la estación.

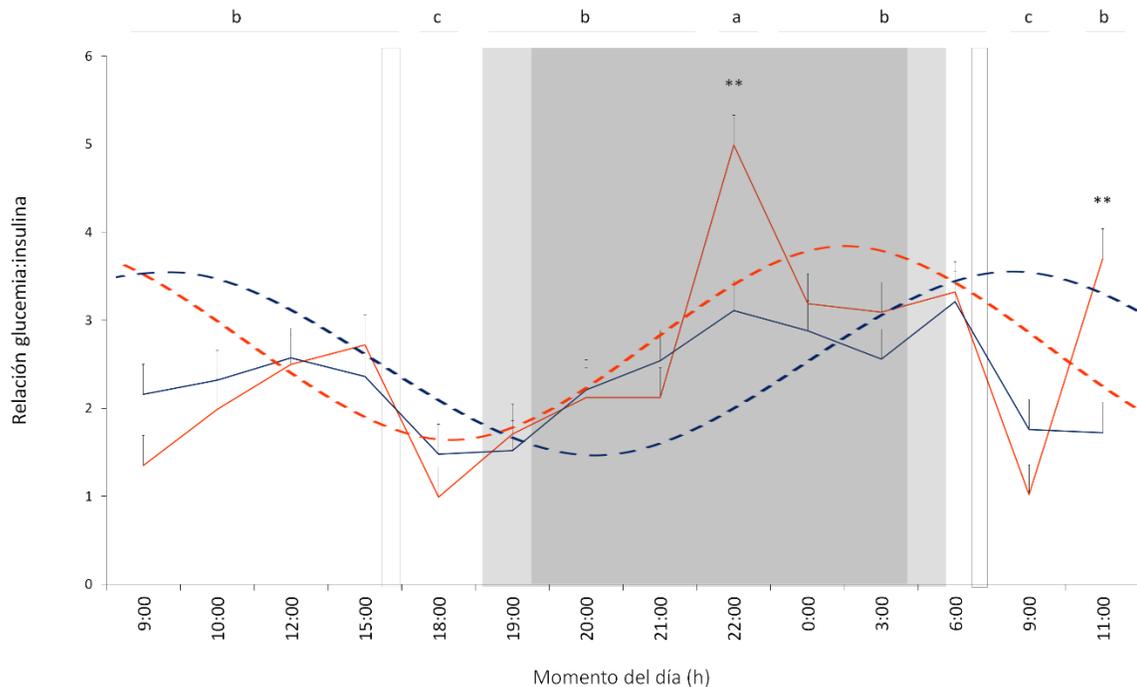


Figura 9. Cambios estacionales en el patrón de variación diario de la relación glucemia:insulina en carneros Corriedale.

Naranja: estación reproductiva; azul: estación no reproductiva. Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Las áreas grises indican los periodos de oscuridad en cada estación. Las barras verticales indican los momentos de suministro de alimento. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b vs c: $P \leq 0.05$. ** $P \leq 0,01$ indica diferencias entre las estaciones en ese momento del día.

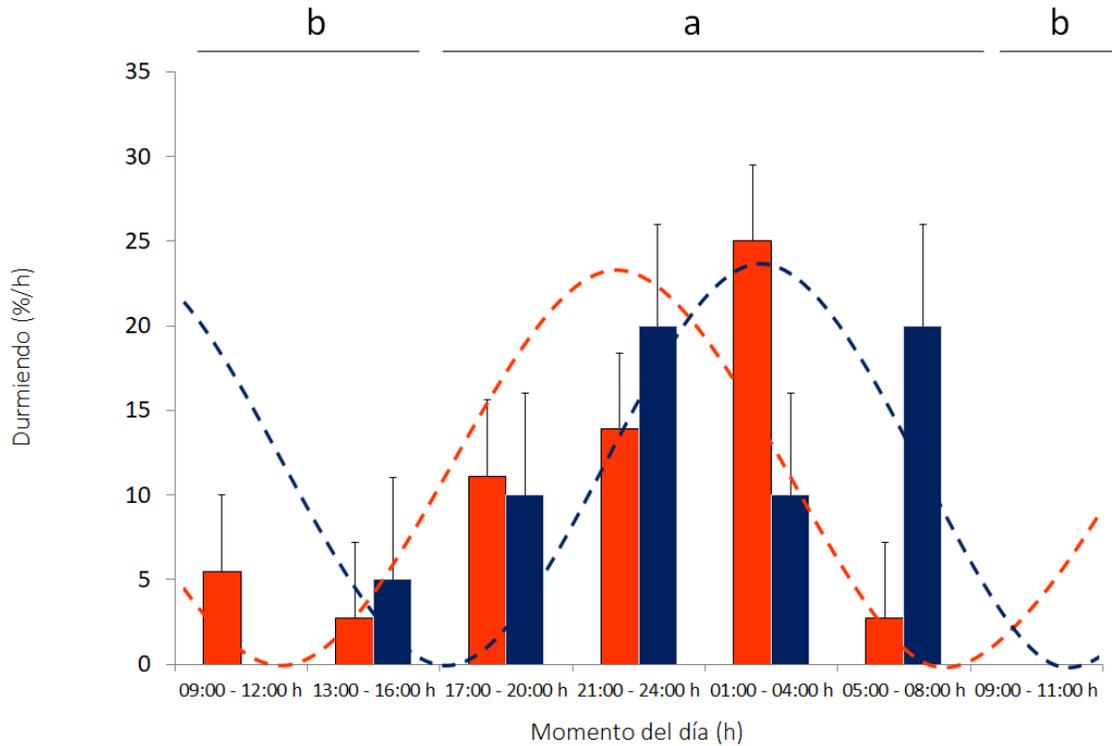


Figura 10. Cambios estacionales en el patrón de variación diario del tiempo dedicado a dormir en carneros Corriedale.

Naranja: estación reproductiva; azul: estación no reproductiva. Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b; $P \leq 0,01$. ** $P \leq 0,01$ indica diferencias entre las estaciones en ese momento del día.

El patrón de variación diario de la temperatura superficial fue diferente entre estaciones. Durante la estación reproductiva hubo un mayor mesor (fosa lagrimal proximal y distal externa, base de la oreja), una menor amplitud (ojo completo, fosa lagrimal proximal y distal externa, base de la oreja) y una acrofase más tardía (ojo completo y nariz) que en la estación no reproductiva ($P < 0,01$ en todos los casos) (Figura 8 y 11).

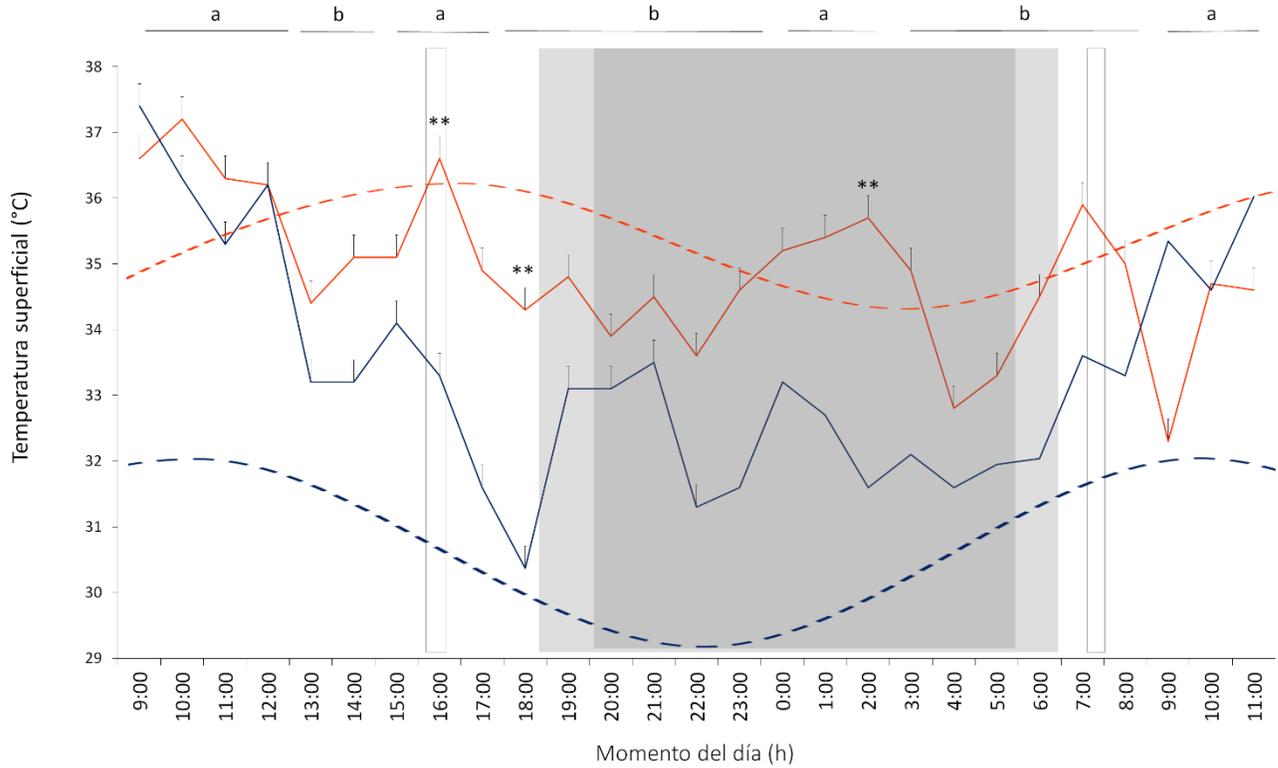


Figura 11. Cambios estacionales en el patrón de variación diario de la temperatura superficial medida a nivel del ojo en carneros Corriedale.

Naranja: estación reproductiva; azul: estación no reproductiva. Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Las áreas grises indican los periodos de oscuridad en cada estación. Las barras verticales indican los momentos de suministro de alimento. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b: $P \leq 0.05$. ** $P \leq 0,01$ indica diferencias entre las estaciones en ese momento del día.

6.3. *Experimento III. Efecto de la administración de eCG sobre el patrón de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo energético y comportamiento en carneros enteros durante la estación no-reproductiva. (Artículo III).*

Objetivos

- Comparar el efecto de la administración de eCG en carneros enteros durante la estación no reproductiva sobre el patrón de variación diario de:
 - o las concentraciones de cortisol e insulina, glucemia y la relación glucemia:insulina.
 - o la temperatura superficial medida a nivel rostral y del ojo.
 - o el porcentaje del tiempo que los animales dedican a comer, rumiar, estar parados, estar echados y dormir.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Veterinaria, Udelar (34°54' S; 56°11' O) durante agosto y septiembre (finales de invierno y principios de primavera), utilizando 20 carneros adultos Corriedale (PV: 63,4 ± 7,3 kg; CC: 3,5 ± 0,5; media ± DE; edad: 2-3 años). Tanto el periodo de acostumbramiento como el manejo general fue igual al descrito en el Experimento 2.

Tratamientos experimentales

Los carneros fueron asignados al azar a los siguientes tratamientos: (a) Tratados: administración individual de una dosis única intramuscular de 1000 UI de eCG (Novormon, Syntex, Montevideo, Uruguay) 24 h antes de comenzar la toma de muestras de sangre (n=10); (b) Control: sin administración de la eCG (n=10). Para asegurar que todos los registros se hicieran lo más cercano a la hora de medición, el estudio tuvo 2 repeticiones (A y B), separadas por una semana, con 5 animales por tratamiento en cada una (total, 10 animales en cada repetición o muestreo).

Condiciones ambientales

Los registros de temperatura ambiente y la humedad relativa, así como el cálculo del ITH, fueron similares a lo descrito para el Experimento 2. La temperatura ambiental mínima y máxima se

presentaron a las 06:00 h ($8,8 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$) y al mediodía ($22,6 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$), respectivamente. Las medias de humedad relativa superaron el 70 %, con valores máximos (100 %) durante la noche. La variación diaria entre el ITH mínimo y el máximo fue de ~ 20 unidades para ambas repeticiones, con valores mínimos a las 06:00 h ($47,9 \pm 3,0$ unidades) y valores máximos a las 12:00 h ($67,4 \pm 3,0$ unidades). La salida del sol ocurrió a las 07:01 y la puesta del sol a las 18:27.

Registros de comportamiento

Las actividades efectuadas por los carneros fueron determinadas como se describió en el Experimento 2.

Temperatura superficial

Las temperaturas superficiales del rostro y el ojo (córnea) fueron determinadas como se describió en el Experimento 2.

Muestreo de sangre y determinaciones

El muestreo de sangre y su frecuencia es igual al descrito en el Experimento 2. Las concentraciones séricas de testosterona y cortisol se midieron utilizando un kit comercial de RIA. La concentración de testosterona se determinó 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. La concentración de cortisol se midió en todas las muestras (27 muestras por animal). Respecto a la concentración de insulina, se midió con un kit de IRMA en las mismas muestras utilizadas para la testosterona. La glucemia se midió por colorimetría utilizando un kit comercial en todas las muestras. Finalmente, se calculó la relación glucemia: insulina, como se describió en los Experimentos 1 y 2.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se presenta, para los 4 experimentos, al final de esta sección.

Resultados

Las características del patrón de variación diario de la concentración de cortisol, glucemia, relación glucemia:insulina y temperatura superficial de los carneros no fueron afectadas por la administración de eCG, presentándose las acrofases a las $\sim 06:00$ h, $\sim 18:00$ h, $\sim 08:00$ h y $\sim 11:00$ h,

respectivamente (Figura 12). Pese a ello, en los carneros tratados, las concentraciones medias tanto de testosterona como de cortisol fueron superiores a las de los carneros control (testosterona: $32,7 \pm 0,7$ nmol/L vs. $5,8 \pm 0,7$ nmol/L, $P < 0,0001$; cortisol: $11,3 \pm 0,6$ nmol/L vs. $9,9 \pm 0,6$ nmol/L, $P = 0,02$, respectivamente). Contrariamente, la temperatura superficial fue inferior ($\sim 0,9$ °C) en los carneros tratados que en los carneros control ($P = 0,004$).



Figura 12. Patrones de variación diario de carneros Corriedale tratados o no con eCG. Se presentan las horas del día en que se observaron los valores máximos (acrofases) de las variables consideradas. Diferentes colores para una misma variable indican que la acrofase fue diferente de acuerdo a la estación. Las áreas gris y blanca representan las horas de oscuridad y luz durante la evaluación.

La acrofase de la concentración de insulina se adelantó en los carneros tratados en comparación con los carneros control ($13:02 \pm 0:56$ vs. $15:47 \pm 0:53$; $P = 0,04$) (Figura 13). Adicionalmente, el momento en que se presentaron las acrofases del tiempo dedicado a comer y del tiempo dedicado a dormir se adelantó en los carneros tratados (comer: $09:48 \pm 00:16$ frente a $10:20 \pm 00:16$, $P = 0,04$, Figura 14a; dormir: $21:39 \pm 00:57$ frente a $02:02 \pm 01:06$, $P < 0,0001$, Figura 14b). No obstante, los carneros tratados durmieron menos tiempo que los carneros control ($P = 0,04$).

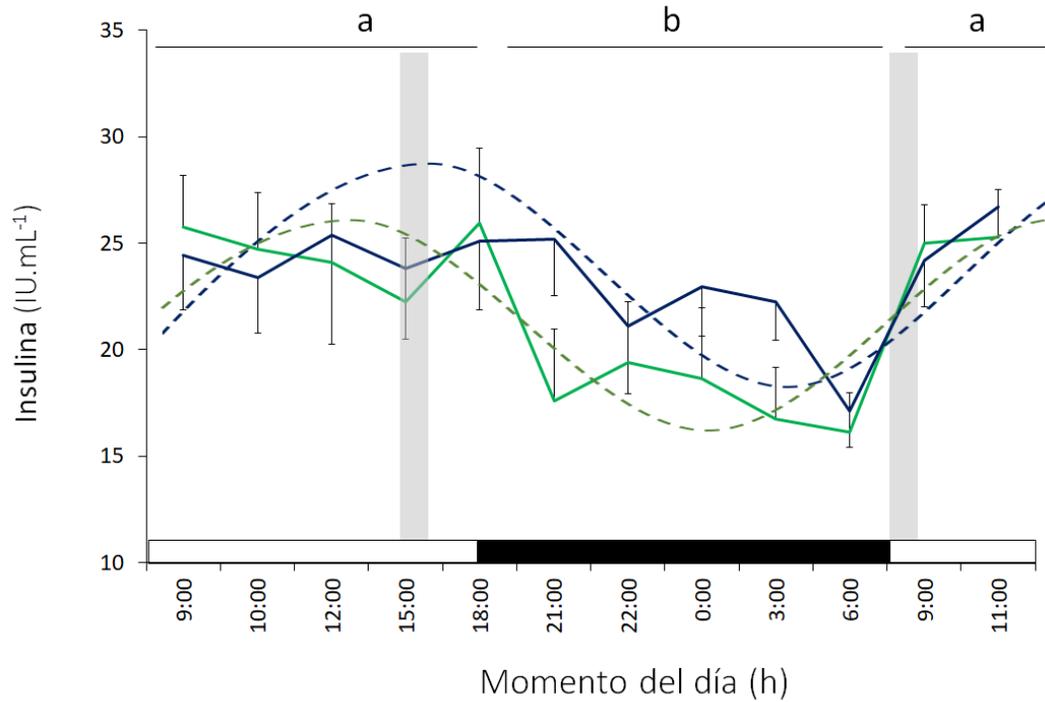


Figura 13. Cambios en el patrón de variación diario de la concentración de insulina en carneros a los que se les administró eCG (verde) y al grupo control (azul).

Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Las barras blancas y negras indican los periodos de luz-oscuridad. Las barras verticales indican los momentos de suministro de alimento. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b: $P \leq 0.05$.

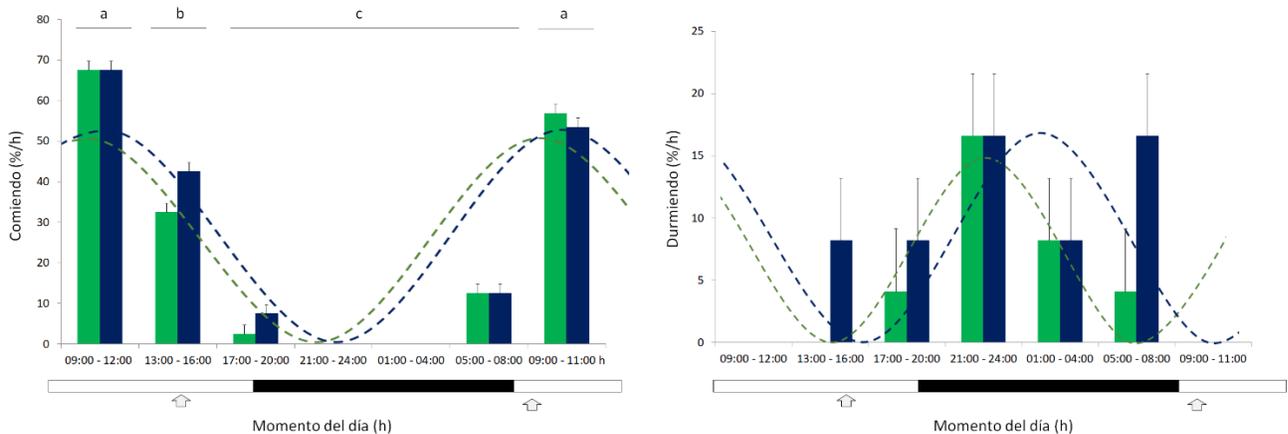


Figura 14. Cambios en el patrón de variación diario del tiempo dedicado a comer y a dormir en carneros a los que se les administró eCG (verde) y al grupo control (azul).

Las líneas punteadas representan el acrofasograma para cada estación. Diferencias entre horas (momento del día): a vs b vs c; $P \leq 0,01$.

6.4. *Experimento IV. Efecto de la administración aguda o crónica de testosterona sobre el patrón de variación diario del metabolismo glucídico, temperatura corporal y comportamiento de corderos castrados al nacer. (Datos preliminares, aún no publicado).*

Objetivos

- Comparar el efecto de la administración aguda o crónica de testosterona en corderos castrados al nacer sobre el patrón de variación diario de:
 - el porcentaje del tiempo que los animales dedican a comer, rumiar, estar parados, estar echados y dormir.
 - la temperatura rectal y la temperatura superficial medida a nivel rostral y del ojo.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental N° 1 de Migues (Facultad de Veterinaria, Udelar (34°29' S; 55°37' O) durante febrero y marzo (finales del verano), utilizando 15 corderos cruce de Corriedale x Pool Dorset y 15 corderos cruce de Merilin x Finish (PV: 38,4 ± 3,7 kg; media ± DE; edad: 8-9 meses), todos castrados al nacer. Las madres, pertenecientes al Campo, fueron manejadas en condiciones extensivas, como una majada única, a pastoreo a cielo abierto en campo natural. Los corderos fueron destetados a los 4 meses de edad y posteriormente a eso, manejados en condiciones extensivas, tal como fue descrito para sus madres. El tipo de parto y/o nacimiento no fue considerado para la selección del grupo experimental.

Tanto el periodo de acostumbramiento como el manejo general fueron similares a lo descrito en los experimentos anteriores, es decir, los corderos fueron estabulados en corrales individuales, con sombra artificial, al aire libre, durante las 07:00 h a 15:00 h. El resto del tiempo permanecieron en corrales, también a cielo abierto, de acuerdo al grupo de muestreo, como se describirá más adelante. En este caso, el periodo de acostumbramiento fue de 14 días. Los corderos fueron alimentados, siguiendo las recomendaciones de la NRC (2007) de acuerdo con el peso y procurando ganancias de 100 g/d, con heno de alfalfa y alimento concentrado comercial (250 g/ animal/d), suministrados en dos momentos (08:00 y 15:00 h) y acceso a agua *ad libitum*.

Tratamientos experimentales

Los corderos fueron asignados, balanceados según raza y peso corporal, a los siguientes tratamientos, con 10 animales por grupo: a) Control: sin administración de testosterona; b) 1DT: administración de una dosis única de testosterona (100 mg de ciclopentilpropionato) 48 h antes de iniciar las mediciones; c) 3DT: administración de una dosis semanal de testosterona (100 mg de ciclopentilpropionato), por 3 semanas consecutivas. En este caso, la última dosis de testosterona se administró 48 h antes de iniciar las mediciones. Para asegurar que las mediciones se efectuaran en el tiempo y forma previsto, los tratamientos y muestreos se efectuaron en dos repeticiones de 5 animales por grupo en una semana, y los otros 5 la siguiente.

Condiciones ambientales

Los registros de temperatura ambiente y humedad relativa, así como el cálculo del ITH, fueron similares a los descritos en los otros experimentos. La temperatura ambiental mínima y máxima se presentaron durante la madrugada (entre las 01:00 h y las 08:00 h: $12,4 \pm 0,6$ °C) y primeras horas de la tarde (entre las 14:00 h y las 17:00 h: $26,2 \pm 1,4$ °C), respectivamente. Los valores más bajos de humedad relativa se presentan al final de la tarde (entre las 15:00 h y las 18:00 h; ~ 50 %) y los valores máximos durante la fase nocturna (entre las 21:00 h y las 07:00 h; ~ 90 %). La variación diaria entre el ITH mínimo y el máximo fue de ~20 unidades, con valores mínimos a las 05:00 h ($53,0 \pm 3,0$ unidades) y valores máximos a las 16:00 h ($76,4 \pm 2,0$ unidades). La salida del sol ocurrió a las 06:40 y la puesta del sol a las 19:00 (Figura 15).

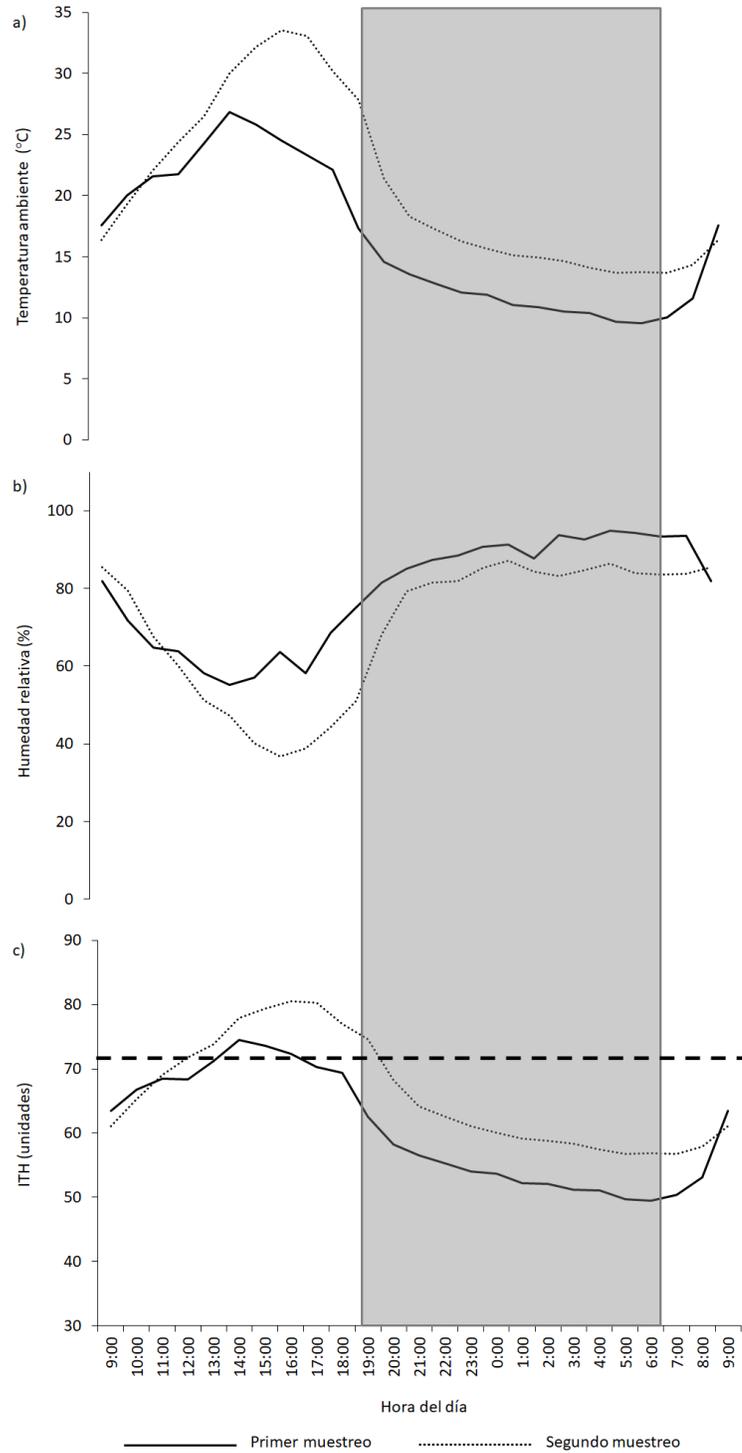


Figura 15. Temperatura ambiente (a), humedad relativa (b) e índice de temperatura-humedad (ITH) (c) durante los muestreos efectuados. En gris: horas de oscuridad. Línea punteada indica que umbral de ITH > 72 unidades (valor considerado como alerta de estrés térmico o estrés térmico moderado).

Registros de comportamiento

Las actividades efectuadas por los corderos fueron registradas igual que en los otros experimentos. En cada grupo de evaluación las actividades fueron registradas cada hora, durante 48 h continuas. Los registros de comportamiento y el resto de las mediciones, fueron efectuadas por dos grupos de personas entrenadas (siempre los mismos), que rotaban cada 6 h. Cada grupo estaba conformado por 3 personas.

Temperatura rectal y superficial

Las temperaturas superficiales del rostro y el ojo (córnea) fueron determinadas como se describió en los Experimento II y III. Posteriormente a los registros termográficos, se determinó la temperatura rectal (termómetro digital). En cada grupo de evaluación las temperaturas fueron determinadas cada hora, por 48 h continuas.

Resultados

Patrón de variación del tiempo dedicado a efectuar las actividades

En las Tablas 1 y 2 se presentan los efectos del tratamiento, hora del día y su interacción, sobre el porcentaje del tiempo en que se observó a los corderos efectuando cada actividad evaluada y las características del patrón de variación diario de cada una de ellas, respectivamente. No se observaron efectos de la administración, aguda (1DT) o crónica (3DT), de testosterona ni de la interacción de los tratamientos con el tiempo en ninguna variable. Las actividades efectuadas por los corderos cambiaron solo con la hora del día ($P < 0,0001$, para todas). El mayor tiempo dedicado a comer se registró durante las horas de luz (entre las 09:00 h y las 16:00 h), se redujo al atardecer (de 17:00 h a 20:00 h) y fue prácticamente nulo durante las horas nocturnas (de 21:00 h a 04:00 h) ($P < 0,0001$). Se observó un retraso de ~ 1 h en el tiempo dedicado a comer de los corderos a los que se les administró 3DT respecto a los corderos del grupo control y a los que se les administró 1DT ($P = 0,03$; Tabla 2).

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados \pm EE (error estándar de la media) y principales efectos de la administración aguda (1DT) o crónica (3DT) de testosterona, hora del día (tiempo) y su interacción en las actividades realizadas por los corderos durante el día.

Variable	Tratamiento				P valores		
	Control	1DT	3DT	EE	Tratamiento	Tiempo	Interacción entre tratamiento y tiempo
Comiendo	17,8	17,3	18,8	1,4	ns	<0,0001	ns
Rumiando	20,3	19,3	21,5	2,5	ns	<0,0001	ns
Parados	26,7	25,9	28,3	1,6	ns	<0,0001	ns
Echados	71,8	72,7	71,8	2,5	ns	<0,0001	ns
Durmiendo	13,8	16,9	17,6	1,8	ns	<0,0001	ns

ns: no significativo

La rumia se observó principalmente durante las horas nocturnas e inicio de la fase lumínica del día ($P < 0,0001$). En todos los tratamientos, la acrofase del tiempo dedicado a rumiar se presentó ~ 05:00 h (Tabla 2). El mayor tiempo dedicado a estar parados se presentó durante la fase diurna (~ 50 % del tiempo es dedicado a estar de pie entre las 09:00 h y las 16:00 h); en cambio, el menor tiempo parados se presentó entre la 01:00 y las 04:00 h (< 5 % del tiempo) ($P < 0,0001$). En todos los tratamientos la acrofase del tiempo dedicado a estar parados se presentó al mediodía.

Los corderos fueron frecuentemente observados echados durante el día. Entre las 21:00 h y las 24:00 h del día, ~ 90 % del tiempo los corderos permanecieron echados, coincidiendo con el momento en que se presentó su acrofase (~ 23:00 h). Respecto a dormir, los corderos fueron observados durmiendo incluso durante del día (entre las 13:00 h y las 20:00 h) y antes del amanecer (entre las 01:00 h y las 04:00 h) ($P < 0,0001$). No obstante, la acrofase del tiempo dedicado a dormir se presentó, para todos los tratamientos ~ 20:00 h.

Temperaturas

En las Tablas 3 y 4 se presentan los efectos del tratamiento, hora del día y su interacción, sobre las temperaturas rectales y superficiales de los corderos y las características del patrón de variación diario de cada una de ellas, respectivamente. La temperatura rectal y las temperaturas superficiales solo variaron con la hora del día, sin efectos del tratamiento o de éste con la hora de evaluación. Los tratamientos tampoco afectaron las características del patrón de variación diario de las temperaturas evaluadas. Solo se observó una tendencia a adelantar la acrofase de la temperatura tomada a nivel del

lagrimal interno ($P = 0,07$). La temperatura rectal estuvo ~ 39 °C y su acrofase se presentó $\sim 18:00$ h. Las temperaturas superficiales estuvieron ~ 37 °C y su acrofase se presentó $\sim 15:00$ h.

Table 2. Medias de mínimos cuadrados \pm EE (error estándar de la media) de las características del patrón de variación diario del comportamiento de corderos castrados al nacer a los que se les administró testosterona en forma aguda (1DT) y crónica (3DT).

Variable	Mesor	Amplitud	Acrofase (h) ¹	Robustez (%)
Comiendo (% del día)				
Control	17,3 \pm 1,2	17,9 \pm 1,9	11:06 \pm 00:24 ^b	51,4 \pm 6,3
1DT	16,8 \pm 1,2	19,1 \pm 1,9	10:24 \pm 00:24 ^b	55,2 \pm 5,9
3DT	18,6 \pm 1,2	18,5 \pm 1,9	12:00 \pm 00:24 ^a	47,6 \pm 5,9
Rumiando (% del día)				
Control	18,3 \pm 2,1	14,9 \pm 2,4	05:13 \pm 00:54	33,3 \pm 5,3
1DT	17,4 \pm 2,1	14,5 \pm 2,4	04:00 \pm 00:54	40,5 \pm 5,6
3DT	19,3 \pm 2,1	16,0 \pm 2,4	06:42 \pm 00:54	37,9 \pm 5,6
Parados (% del día)				
Control	27,0 \pm 1,9	24,1 \pm 2,8	12:00 \pm 00:24	59,9 \pm 6,5
1DT	27,5 \pm 1,9	23,5 \pm 2,8	11:36 \pm 00:24	49,2 \pm 6,2
3DT	29,1 \pm 1,9	26,1 \pm 2,8	11:54 \pm 00:24	55,2 \pm 6,2
Echados (% del día)				
Control	71,4 \pm 1,9	23,3 \pm 2,7	23:06 \pm 00:24	44,5 \pm 6,7
1DT	72,4 \pm 1,9	21,9 \pm 2,7	23:36 \pm 00:24	49,1 \pm 7,0
3DT	71,9 \pm 1,9	23,6 \pm 2,7	23:18 \pm 00:24	52,3 \pm 7,0
Durmiendo (% del día)				
Control	15,3 \pm 2,4	10,2 \pm 1,2	20:42 \pm 02:18	28,8 \pm 3,7
1DT	19,0 \pm 2,4	8,4 \pm 1,2	18:54 \pm 02:18	19,2 \pm 4,2
3DT	20,3 \pm 2,5	7,5 \pm 1,2	20:48 \pm 02:18	20,8 \pm 4,2

¹Valores se ajustan a la hora de 24 h

^{a,b}Letras diferentes en la misma columna: $P < 0,05$

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados \pm EE (error estándar de la media) y principales efectos de la administración aguda (1DT) o crónica (3DT) de testosterona, la hora del día y su interacción en las temperaturas corporales ($^{\circ}$ C) de los corderos.

Temperatura	Tratamiento				P valores		
	Control	1DT	3DT	EE	Tratamiento	Tiempo	Interacción entre tratamiento y tiempo
Rectal	39,1	39,1	39,0	0,2	ns	<0,0001	ns
Ojo (córnea)	36,8	36,8	36,8	0,03	ns	<0,0001	ns
Lagrimal interno	37,4	37,4	37,4	0,05	ns	<0,0001	ns
Lagrimal externo							
Proximal	37,4	37,4	37,2	0,04	ns	<0,0001	ns
Distal	36,9	37,1	37,0	0,05	ns	<0,0001	ns

ns: no significativo

Table 4. Medias de mínimos cuadrados \pm EE (error estándar de la media) de las características del patrón de variación diario de la temperatura corporal de corderos castrados al nacer a los que se les administró testosterona en forma aguda (1DT) o crónica (3DT).

Temperatura	Mesor	Amplitude	Acrophase (h) ¹	Robustness (%)
Rectal				
Control	39,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,02	17:17 \pm 00:55	43,4 \pm 4,3
1DT	39,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,02	18:29 \pm 00:55	38,9 \pm 4,3
3DT	39,0 \pm 0,1	0,3 \pm 0,02	17:38 \pm 00:55	37,3 \pm 4,3
Ojo (córnea)				
Control	36,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,08	15:12 \pm 00:36	22,8 \pm 2,7
1DT	36,8 \pm 0,1	0,3 \pm 0,08	15:41 \pm 00:36	24,9 \pm 2,7
3DT	36,8 \pm 0,1	0,4 \pm 0,08	15:00 \pm 00:36	22,8 \pm 2,7
Lagrimal interno				
Control	37,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,05	14:53 \pm 00:18	30,6 \pm 2,5
1DT	37,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,05	15:26 \pm 00:18 [†]	25,3 \pm 2,5
3DT	37,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,05	14:32 \pm 00:18	27,0 \pm 2,5
Lagrimal proximal externo				
Control	37,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,05	15:23 \pm 00:26	24,3 \pm 3,8
1DT	37,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,05	15:38 \pm 00:26	26,5 \pm 3,8
3DT	37,2 \pm 0,3	0,4 \pm 0,05	15:46 \pm 00:26	20,6 \pm 3,8
Lagrimal distal externo				
Control	37,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,01	14:22 \pm 00:37	25,7 \pm 4,7
1DT	37,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,01	15:13 \pm 00:37	31,7 \pm 4,5
3DT	37,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,01	14:32 \pm 00:37	29,5 \pm 5,9

¹Valores se ajustan a la hora de 24 h

[†]: Tendencia: P = 0,07

Análisis estadístico para los 4 experimentos

En los 4 experimentos la unidad experimental fue cada animal. Todas las variables fueron analizadas con modelos mixtos (proc mixed; SAS University Edition), previa confirmación de su normalidad. El modelo incluyó el efecto del tratamiento (Experimento I: fase folicular vs fase luteal; Experimento II: estación reproductiva vs estación no-reproductiva; Experimento III: tratados con eCG vs control; Experimento IV: administración aguda de testosterona, administración crónica de testosterona y control), el tiempo de medición como medida repetida y las interacciones respectivas. La repetición en el muestreo (Experimentos I, III y IV), fue incluido como efecto aleatorio. La estructura de varianza-covarianza que mejor se ajustó a los datos fue seleccionada utilizando el criterio Bayesiano (BIC) descrito por Littell et al. (1998).

Además, para determinar las características del patrón de variación diario, se efectuó un análisis cosinor (Program Cosinor.exe, version 3.1). Las características determinadas fueron: amplitud (mitad de la diferencia entre el valor mayor o menor), mesor (el nivel medio del ritmo), acrofase (hora en que se presenta el valor máximo) y robustez (fuerza del ritmo). Para el análisis se asumió que el periodo del patrón de variación fue de 24 h. Posteriormente, los resultados fueron comparados de acuerdo con los tratamientos, usando modelos mixtos, incluyendo la repetición como efecto aleatorio (Experimentos I, III y IV). Los resultados fueron considerados significativos cuando $P \leq 0,05$ y, las tendencias cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

7. DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis se estudió el rol modulador que ejercen los esteroides sexuales en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol, metabolismo y comportamiento en ovinos, utilizando diferentes modelos y aproximaciones: fase del ciclo estral en ovejas, época del año y de la administración de eCG en carneros adultos, y tratamientos de testosterona en corderos castrados. La mayoría de los trabajos en el tema han sido realizados en roedores (Elderbrock et al., 2021), por lo que, hasta donde puede conocerse, estos serían los primeros trabajos que abordan esta temática en ovinos expuestos, además, a condiciones ambientales naturales. En general, los factores evaluados indujeron pocos cambios en los patrones de variación diario considerados, demostrando así que algunos patrones evolutivos son rígidos (Paranjpe y Sharma, 2005; van der Veen et al., 2017), limitando el efecto de los esteroides sexuales en su patrón basal. En tal sentido, la modulación de los esteroides sexuales en los patrones de variación diario evaluados en esta Tesis fue algo mayor en las ovejas, pero casi nulos en los machos. En conjunto, estos resultados permiten visualizar como en condiciones naturales, tanto la información fótica (fotoperiodo) como la no fótica (esteroides sexuales, temperatura ambiente) convergen para permitir la adaptación fisiológica y de conducta de los ovinos durante los cambios más o menos predecibles presentados durante el día (homeostasis predictiva).

Los resultados del Experimento I demuestran la plasticidad en el patrón de variación de la concentración de cortisol presentado en las hembras. De acuerdo con reportes de Freitas-de-Melo et al. (2013) y Freitas-de-Melo y Ungerfeld (revisión: 2022) las ovejas están menos estresadas en los momentos en que las concentraciones de progesterona son altas (gestación y/o fase luteal). La menor concentración de progesterona durante la fase folicular podría aumentar la sensibilidad y/o la percepción de las hembras a diferentes factores y desafíos ambientales, los que pudieron desencadenar, como respuesta adaptativa, una mayor secreción de cortisol (Bonier et al., 2009). Lo anterior explicaría el incremento de la concentración de cortisol, así como el cambio en su patrón de variación diario, presentados en la fase folicular. En tal sentido, es importante considerar que, si bien este Experimento fue efectuado durante la época fresca en la región, las mayores concentraciones de cortisol de la fase folicular coincidieron con los momentos del día en los que el $ITH > 72$ [umbral de alerta por estrés térmico en la mayoría de las especies de interés productivo; Mendes et al. (2014); El-Tarabany et al. (2017)], por lo que los resultados pudieran estar influidos por condiciones de estrés calórico. No obstante, existen reportes de incrementos en la concentración de cortisol durante la fase

folicular, tanto en ovinos (Sosa et al., 2013) como en elefantes hembras (Fanson et al., 2014), que reforzarían la interpretación de que los resultados presentados en esta Tesis no son una mera consecuencia de una situación de estrés. En todo caso, la plasticidad en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol durante el ciclo estral podría desencadenar cambios metabólicos que favorecen la reproducción. En resumen, las ovejas son capaces de ajustar en forma rápida el patrón de variación diario de la concentración de cortisol de acuerdo con los cambios en las concentraciones de los esteroides sexuales del ciclo estral. Contrariamente, en los machos, el patrón de variación diario de la concentración de cortisol parece ser menos sensible al efecto modulador de los esteroides sexuales, o al menos, cuando éstos se incrementan en forma aguda fuera de la estación reproductiva.

La testosterona parece tener un efecto modulador menor sobre los cambios en el patrón de variación de cortisol de los machos. En el Experimento III, aunque el incremento agudo de testosterona provocado por la administración de eCG en la estación no reproductiva se asoció con una mayor concentración de cortisol, no se presentaron diferencias entre el grupo control y el tratado en ninguna de las características del patrón de variación diario de la concentración de cortisol. Lo anterior, como fue mencionado previamente, podría indicar que, en los machos, la sensibilidad del sistema circadiano de realizar ajustes rápidos en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol probablemente no está presente o es más rígido que en las hembras. Una explicación complementaria sería que la variación estacional en el patrón de variación de la concentración de cortisol no es modulada directamente por la testosterona, sino por otros mediadores. A tal efecto, en el Experimento II, durante la estación no reproductiva (invierno; menores temperaturas ambientales), cuando naturalmente se presentan las menores concentraciones de testosterona en los carneros, hubo una mayor concentración de cortisol, una mayor amplitud y una tendencia a una acrofase más temprana en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol que durante la estación reproductiva (verano; mayores temperaturas ambientales), cuando naturalmente se presentan las mayores concentraciones de testosterona.

No hubo variación diaria en la glucemia ni en la sensibilidad a la insulina, pero la primera fue mayor y la segunda menor durante la fase folicular del ciclo estral en las ovejas. Esto podría favorecer la utilización de glucosa en esta etapa, tanto a nivel central como ovárico, promoviendo la maduración folicular y la ovulación (Lucy et al., 1991) y respondiendo a la mayor demanda por mayor actividad física en esta etapa (López-Gatius et al., 2005). Estos cambios metabólicos, que favorecen la reproducción en la hembra, podrían no ser consecuencia directa de la modulación de los esteroides

sexuales, pero si, asociarse con la plasticidad en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol durante el ciclo estral, como se había mencionado previamente. Similarmente, en los machos, la modulación ejercida por la testosterona en el patrón de variación de la sensibilidad a la insulina podría ser limitada. En tal sentido, en el Experimento III, que también se efectuó en el invierno, el adelanto de acrofase de la concentración de insulina no estuvo acompañado de modificaciones en el patrón de variación de la sensibilidad a la insulina. No obstante, los cambios estacionales en la sensibilidad a la insulina presentados en los carneros reflejan mecanismos adaptativos asociados a la utilización de la glucosa disponible de acuerdo a la época del año. En tal sentido, es interesante que, durante la estación no reproductiva, la menor sensibilidad a la insulina se produzca durante la fase diurna, coincidiendo con la acrofase de la temperatura superficial y, en asociación con la menor concentración de testosterona y el cambio en el patrón de variación diario de la concentración de cortisol (Experimento II). Lo anterior permite especular que, durante el invierno, podría priorizarse el uso de la glucosa disponible al inicio del día hacia mecanismos de termorregulación, limitando su utilización para la reposición de el tejido adiposo y el muscular, que son principalmente dependientes de la insulina (Komatsu et al., 2005). Contrariamente, en la estación reproductiva, la mayor sensibilidad a la insulina durante la fase diurna podría asociarse con el incremento natural de la testosterona de ese momento del año, el que se acompañó de una menor concentración de cortisol.

Los cambios de comportamiento presentados evidencian que los esteroides sexuales influyen sobre los mismos. Si bien en el primer experimento no se determinó el patrón de variación diario de las actividades de las ovejas en forma individual, los resultados generales reflejan estados excitatorios congruentes con el rol activo de la hembra en la reproducción (proceptividad y receptividad) durante la fase folicular (Sutton et al., 2019), el cual, probablemente, es regulado por la concentración de estrógenos (Hatcher et al., 2020). En los machos también se observaron cambios conductuales, particularmente en la acrofase del tiempo dedicado a comer y a dormir, que pueden asociarse con la concentración de testosterona. No obstante, la modulación que ejerce la testosterona en el patrón diario de actividades podría variar de acuerdo al fotoperiodo. Como fue mencionado en los antecedentes, los receptores de andrógeno se localizan, en la región ventrolateral (core) del NSQ, con el tracto retinohipotalámico, principal vía aferente de las señales fóticas (revisión: Yan y Silver, 2016). En ratones, se demostró que los andrógenos pueden modular la capacidad de respuesta del NSQ a la luz y cronometrar el tiempo de inicio y duración de la actividad de correr en la rueda (wheel-running activity) de los animales (Butler et al., 2012). Lo anterior podría explicar los cambios conductuales

presentados en los carneros del Experimento III, realizado en invierno, en los que el incremento agudo de testosterona se asoció con el adelantó con las acrofases del tiempo dedicado a comer y a dormir. Además, los carneros del grupo al que se le administró eCG, durmieron menos tiempo. No obstante, durante la estación reproductiva (verano), la modulación de la testosterona en el patrón de variación de la conducta podría ser limitada o en todo caso sinérgica con el mayor fotoperiodo de ese momento del año (Experimento II). Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en el Experimento IV, efectuado también en el verano, en el cual las características del patrón de variación diario de las actividades evaluadas prácticamente no fueron modificadas por el reemplazo de testosterona. De todas formas, los resultados conductuales obtenidos en esta Tesis deben verse con cautela dado que los animales fueron manejados en corrales individuales, sin interacción con individuos del sexo opuesto, por lo que sería de interés corroborar estas respuestas en condiciones de mayor interacción social. La llegada de tecnologías de biologging y dispositivos de seguimiento genera un campo de oportunidades para profundizar en el tema, pudiendo efectuarse estudios conductuales detallados a largo plazo sobre cómo varía el momento de la exhibición de las conductas entre individuos durante el día y cómo el entorno social las puede modificar.

En esta tesis se demostró que los patrones de variación diario de la temperatura corporal y de la concentración de testosterona son, en general, bastante rígidos. A pesar de que la temperatura rectal solo se midió en los Experimentos I y IV, su acrofase se presenta en forma consistente al final de la tarde independientemente de la fase del ciclo estral de las ovejas y/o tiempo de administración de testosterona en los corderos. Estos resultados concuerdan con reportes previos relacionados con la robustez de los patrones de variación diario de la temperatura corporal previamente reportados en la especie (Recabarren, 1987; Piccione et al., 2002a; Maloney et al., 2013; Piccione et al., 2019). También se observó que la acrofase de la temperatura rectal se presenta unas horas después que la de la temperatura superficial, indicando que esta última podría, como parte del sistema circadiano, ser parte del mecanismo que produce la oscilación de la temperatura central, como fue sugerido por Piccione et al. (2013) y Refinetti (2020). De hecho, el momento del año modificó el patrón de variación diario de la temperatura superficial de los carneros (Experimento II), lo cual permite inferir que, además de ser parte del mecanismo de adaptación estacional de los ovinos, podría permitir mantener el patrón de variación diario de la temperatura corporal, como se mencionó previamente.

Respecto a la concentración de testosterona, los cambios estacionales en los carneros son claros y en concordancia con los reportes previos en condiciones ambientales similares (Pérez-Clariget et al.,

1998; Ungerfeld, 2012). No obstante, los trabajos sobre el patrón de variación diario de la testosterona de acuerdo a la estación son menos conocidos. En este sentido es interesante observar que, con las condiciones experimentales evaluadas, el patrón de variación diario de la concentración de testosterona, específicamente su acrofase, fue similar entre estaciones, presentándose al final de la tarde. Aunque el rol biológico de esta respuesta evolutiva es hasta ahora desconocido, se puede hipotetizar que tanto la acrofase de la temperatura corporal, como se mencionó previamente, como la acrofase de la concentración de testosterona en los carneros, pueden constituir señales sincronizadoras endógenas de otros relojes periféricos. En todo caso, en ambas variables, las acrofases parecen relacionarse con el inicio de la fase de descanso y/o momentos menos activos del día de los animales.

El patrón de variación diario de la temperatura superficial sólo varió entre estaciones (Experimento II), como fue mencionado anteriormente. Durante la estación reproductiva (verano), probablemente para reducir el aumento de la temperatura corporal, se activaron mecanismos homeostáticos reactivos, incluyendo una distribución más homogénea del tiempo dedicado a comer a lo largo del día (Experimento II y Experimento IV), lo cual podría reducir la producción de calor metabólico (Sarout et al., 2018). También, pudo presentarse un aumento del flujo sanguíneo periférico, facilitando la pérdida de calor (Choshniak et al., 1982; Andersson y Jonasson, 1992). Esta última explicación es compatible con los efectos vasodilatadores de la testosterona (Jones et al., 2003; Yildiz y Seyrek, 2007), lo que además es coherente con los resultados obtenidos en el Experimento III, donde se observó una menor temperatura superficial medida a nivel del ojo en los carneros a los que se les administró eCG. Una visión global e integrada permite proponer que, según la estación del año, la testosterona y el cortisol están asociados a diferentes mecanismos de termorregulación. En este sentido, cuando la concentración de testosterona y la temperatura ambiental son menores (estación no reproductiva), la ganancia de calor puede estar asociada a un aumento de cortisol. Sin embargo, cuando la concentración de testosterona y la temperatura ambiental son mayores (estación reproductiva), la testosterona puede favorecer la adaptación del animal participando en la pérdida de calor y, en consecuencia, evitando el incremento de cortisol, si no se superan, como ocurrió en el Experimento II, los umbrales de ITH asociados con el estrés térmico. No obstante, los resultados del Experimento IV no estuvieron en la misma dirección. Una posible explicación a estas diferencias podría ser la menor eficiencia en los mecanismos de disipación de calor por el menor gradiente térmico entre los animales y el ambiente (revisión: Mitchell et al., 2018), presentado en el Experimento IV, el cual pudo haber limitado el efecto vasodilatador de la administración de testosterona. A esto podría

sumarse la mayor proporción superficie/masa de los corderos, que, al ser animales más pequeños, podrían ganar más calor del ambiente (revisión: Mitchell et al., 2018) lo que también reduciría el efecto modulador de la testosterona.

8. CONCLUSIONES.

- La modulación que ejercen los esteroides sexuales en los patrones de variación diarios evaluados fue limitada.
- Las ovejas fueron capaces de ajustar en forma rápida el patrón de variación diario de la concentración de cortisol de acuerdo con la fase del ciclo estral.
- En los carneros los carneros, el patrón de variación diario de la concentración de cortisol es menos sensible al efecto modulador de los esteroides sexuales.
- En los ovinos, los esteroides sexuales participan en la modulación del ciclo actividad:reposo.
- La rigidez presentada en la mayor parte de los patrones de variación diario estudiados refuerza el concepto de que los mismos son respuestas evolutivas, altamente conservadas, que favorecen la adaptación de los animales a la variación del día y la noche.

9. REFERENCIAS

1. Albers HE. 1981. Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. *Am. J. Physiol.* 241: R62–R66. [https://doi.org/ 10.1152/ajpregu.1981.241.1. R62](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.241.1.R62).
2. Alila-Johansson A, Eriksson L, Soveri T, Laakso ML. 2006. The daily rhythms of melatonin and free fatty acids in goats under varying photoperiods and constant darkness. *Chronobiol. Int.* 23: 565-581. doi: 10.1080/07420520600650620.
3. Andersson BE, Jonasson H. 1992. Temperature regulation and environmental physiology. En: Decker BC, editor. *Physiology of Small and Large Animals*. Philadelphia: Hamilton; p. 886–895.
4. Argot CMG, Smith JS, Kay RNB. 1999. Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. *Anim. Sci.* 69:191-202. <https://doi.org/10.1017/S1357729800051237>.
5. Aschoff J, Gerecke U, Wever R. 1967. Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn J. Physiol.* 17:450-457. doi: 10.2170/jjphysiol.17.450.
6. Aschoff J. 1979. Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.* 49: 225–249. doi: 10.1111/j.1439-0310.1979.tb00290.x.
7. Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G. 2001. Stress and neuroactive steroids. *Int. Rev. Neurobiol.* 46: 243-272. doi: 10.1016/s0074-7742(01)46065-x.
8. Ball AJ, Thompson JM, Pleasants AB. 1996. Seasonal changes in body composition of growing Merino sheep. *Livest. Prod. Sci.* 46:173-180. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(96\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(96)00028-0).
9. Barros de Freitas AC, Ortiz Vega WH, Quirino CR, Bartholazzi Junior A, Gomes David CM, Geraldo AT, Silva Rua MA, Cipagauta Rojas LF, Esustáquio de Almeida Filho J, Burla Dias AJ. 2018. Surface temperatura of ewes during estrous cycle measured by infrared thermography. *Theriogenology.* 119: 245-251. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.015.
10. Bassett JM, Mills SC, Reid RL. 1966. The influence of cortisol on glucose utilization on sheep. *Metabolism.* 15:922-932. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(66\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(66)90163-6).
11. Bassett JM, Wallace ALC. 1967. Influence of cortisol on plasma insulin in the sheep. *Diabetes.* 16: 566-571. <https://doi.org/10.2337/diab.16.8.566>.
12. Bebas P, Goodall CP, Majewska M, Neumann A, Giebultowicz JM, Chappell PE. 2009. Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice. *FASEB J.* 23: 523–533. doi: 10.1096/fj.08-113191.
13. Berglund L, Berne C, Svärdsudd K, Garmo H, Melhus H, Zethelius B. 2012. Seasonal variations of insulin sensitivity from a euglycemic insulin clamp in elderly men. *Ups. J. Med. Sci.* 117: 35-40. doi: 10.3109/03009734.2011.628422.
14. Bitman J, Wood DL, Lefcourt AM. 1990. Rhythms in cholesterol, cholesteryl esters, free fatty acids, and triglycerides in blood of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 948-955. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78751-6.
15. Blache D, Maloney SK. 2017. New physiological measures of the biological cost of responding to challenges. En: *Advances in Sheep Welfare*. Editores: Ferguson D, Lee C, Fisher A. 1st Edition. Woodhead Publishing Series in Food Science. Duxford, United Kingdom. p. 73-104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100718-1.00005-4>.
16. Bocquier F, Bonnet M, Faulconnier Y, Guerre-Millo M, Martin P, Chilliard Y. 1998. Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue, metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:489-498. doi: 10.1051/rnd:19980501.
17. Bolli GB, De Feo P, De Cosmo S, Perriello G, Ventura MM, Calcinaro F, Lolli C, Campbell P, Brunetti P, Gerich JE. 1984. Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes.* 33:1150–

1153. doi: 10.2337/diab.33.12.1150.
18. Bondi A. 1989. *Nutrición animal*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
19. Bonier F, Martin PR, Moore IT, Wingfield JC. 2009. Do baseline glucocorticoids predict fitness? *Trends Ecol. Evol.* 24:634–642. doi: 10.1016/j.tree.2009.04.013.
20. Brann D, Mahesh V. 1991. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB J.* 5:2691–2698. doi: 10.1096/fasebj.5.12.1655548.
21. Broom DM, Fraser AF. 2015. *Domestic Animal Behaviour and Welfare*. 5th Edition. pp 472. Wallingford UK: CABI.
22. Buijs RM, Markman M, Nunes-Cardoso B, Hou YX, Shinn S. 1993. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 335:42–54. doi: 10.1002/cne.903350104.
23. Buijs RM, Chun SJ, Nijima A, Romijn HJ, Nagai K. 2001. Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comp. Neurol.* 431:405–423. doi: 10.1002/1096-9861(20010319)431:4<405::aid-cne1079>3.0.co;2-d.
24. Buijs FN, Guzmán-Ruiz M, León-Mercado L, Basualdo MC, Escobar C, Kalsbeek A, Buijs RM. 2017. Suprachiasmatic nucleus interaction with the arcuate nucleus: essential for organizing physiological rhythms. *eNeuro.* 24: ENEURO.0028-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0028-17.2017.
25. Buijs RM, Guzmán-Ruiz MA, Méndez-Hernández R, Rodríguez-Cortés B. 2019. The suprachiasmatic nucleus; a responsive clock regulating homeostasis by daily changing the setpoints of physiological parameter. *Auton. Neurosci.* 218: 43-50. doi: 10.1016/j.autneu.2019.02.001.
26. Burgess HJ, Sharkey KM, Eastman CI. 2002. Bright light, dark and melatonin can promote circadian adaptation in night shift workers. *Sleep Med. Rev.* 6:407-420.
27. Butler MP, Karatsoreos IN, LeSauter J, Silver R. 2012. Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light. *Endocrinology.* 153:2344-2352. doi: 10.1210/en.2011-1842.
28. Cagampang FR, Bruce KD. 2012. The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *Br. J. Nutr.* 108: 381-392. doi: 10.1017/S0007114512002139.
29. Carrasco-Benso MP, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FAJL, Garaulet M. 2016. Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB J.* 30: 3117–3123. doi:10.1096/fj.201600269RR.
30. Castillo MR, Hochstetler KJ, Greene DM, Firmin SI, Tavernier RJ, Raap DK, Bult-Ito. 2005. Circadian rhythm of core body temperature in two laboratory mouse lines. *Physiol. Behav.* 86: 538-545. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.018.
31. Cavigelli SA, Monfort SL, Whitney TK, Mechref YS, Novotny M, McClintock MK. 2005. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *J. Endocrinol.* 184: 153-163. doi: 10.1677/joe.1.05935.
32. Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognié J, Malpoux B, Dufourny L. 2010. Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J. Neuroendocrinol.* 22:110-118. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01939.x.
33. Chan K, Wong FS, Pearson JA. 2022. Circadian rhythms and pancreas physiology: a review. *Front. Endocrinol.* 13:920261. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.920261>.
34. Chaumont S, Freitas-de-Melo A, Pinto-Santini L, Menant O, Zambra N, Ungerfeld R. 2021. Rams recognize and prefer the human who regularly brushed them. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 236:105250.

doi:10.1016/j.applanim.2021.105250.

35. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B. 2008. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 40-47. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01141.x.
36. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature.* 417:405-410. doi: 10.1038/417405a.
37. Chilliard Y, Bocquier F. 2000. Direct effects of photoperiod on lipid metabolism, leptin synthesis and milk secretion in adult sheep. En: Cronje PB, editor. 'Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction'. Wallingford UK: CABI; p. 205–223.
38. Chilibroste P. 2002. Integración de patrones de consumo y oferta de nutrientes para vacas lecheras en pastoreo durante el periodo otoño-invernal. En: Memorias X Congreso Latinoamericano de Buiatría, XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Centro Médico de Paysandú. 1: 90-96.
39. Choshniak I, McEwan-Jenkinson D, Blatchford DR, Peaker M. 1982. Blood flow and catecholamine concentration in bovine and caprine skin during thermal sweating. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol.* 71: 37-42. doi:10.1016/0306-4492(82)90007-7.
40. Clarke SD, Clarke IJ, Rao A, Cowley MA, Henry BA. 2012. Sex differences in the metabolic effects of testosterone in sheep. *Endocrinology.* 153: 123–131. doi: 10.1210/en.2011-1634.
41. Cribbet MR, Logan RW, Edwards MD, Hanlon E, Peek CB, Stubblefield JJ, Vasudevan S, Ritchey F, Frank E. 2016. Circadian rhythms and metabolism: from the brain to the gut and back again. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1385: 21-40. doi: 10.1111/nyas.13188.
42. Dammhahn M, Landry-Cuerrier M, Reale D, Garant D, Humphries MM. 2017. Individual variation in energy-saving heterothermy affects survival and reproductive success. *Funct. Ecol.* 31: 866-875. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12797>.
43. Danfær A, Tetens V, Agergaard N. 1995. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 111:201–210. doi: 10.1016/0305-0491(94)00242-m.
44. de Combellas J. 1993. Comportamiento reproductivo en ovinos tropicales. *Rev. Científica, FCV-LUZ.* 111: 135-141.
45. Dillon J, Grigera J. 2011. Hablando de bienestar- confort animal. *Sitio Argentino de Producción Animal. Producir XXI.* 19:37-44.
46. Duffy JF, Cain SW, Chang AM, Philips AJK, Münch MY, Gronfier C, Wyatt JK, Dijk DJ, Wright KP, Czeisler CA. 2011. Sex difference in the near-24-hour intrinsic period of the human circadian timing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:15602–15608. DOI: 10.1073/pnas.1010666108.
47. Ehnert K, Moberg GP. 1991. Disruption of estrous behaviour in ewes by dexamethasone or management-related stress. *J. Anim. Sci.* 69: 2988-2994. doi: 10.2527/1991.6972988x.
48. Eicher R, Liesegang A, Bouchard W, Tremblay A. 1999. Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood metabolites in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 60:1493-1499.
49. Elderbrock EK, Hau M, Greives TJ. 2021. Sex steroids modulate circadian behavioral rhythms in captive animals, but does this matter in the wild? *Horm. Behav.* 128: 104900. doi: 10.1016/j.yhbeh.2020.104900.
50. El-Tarabany MS, El-Tarabany AA, Atta MA. 2017. Physiological and lactation responses of Egyptian dairy Baladi goats to natural thermal stress under subtropical environmental conditions. *Int. J. Biometeorol.* 61: 61-68. doi: 10.1007/s00484-016-1191-2.

51. Encinozo-González O, Camacaro-Calvete S, Pinto-Santini L, Ríos-de-Álvarez L. 2017. Effect of the presence of shade in sheep grazing areas. 1. Selection of forage species. *Pastos y Forrajes*. 40: 61-68.
52. Fanson KV, Keeley T, Fanson BG. 2014. Cyclic changes in cortisol across the estrous cycle in parous and nulliparous Asian elephants. *Endocr. Connect.* 15:57-66. doi: 10.1530/EC-14-0025.
53. Fernández-Abella D, Saldanha S, Surraco L, Villegas N, Hernández Z, Rodríguez P. 1994. Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*. 4:19-43.
54. Fessler DMT. 2003. No time to eat: an adaptationist account of periovulatory behavioral changes. *Q. Rev. Biol.* 78: 3-21. doi: 10.1086/367579.
55. Freitas-de-Melo A, Banchero G, Hötzel MJ, Damián JP, Ungerfeld R. 2013. Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal*. 7: 1367-1373. doi: 10.1017/S1751731113000621.
56. Freitas-de-Melo A, Damián JP, Hötzel MJ, Banchero G, Ungerfeld R. 2016. Progesterone pretreatment increases the stress response to social isolation in ewes. *Hormones*. 15: 81-87. doi: 10.14310/horm.2002.1625.
57. Freitas-de-Melo A, Ungerfeld R. 2022. Impact of sex steroids on the stress response and welfare in female farm ruminants. En: *Sustainable Agriculture Reviews (SARV, volume 57)*. Yata VK, Mohanty AK, Lichtfouse E (Editores). P1-26.
58. Gardy-Godillot M, Durand D, Dalle M, Bauchart D. 1989. Diurnal pattern of plasma cortisol in preruminant calves fasted or fed different milk proteins. *J. Dairy Sci.* 72: 1842-1846. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79301-2.
59. George WD, Godfrey RW, Ketring RC, Vinson MC, Willard ST. 2014. Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 92: 4949-4955. doi:10.2527/jas.2014-8087.
60. Giannetto C, Giudice E, Acri G, Fazio F, Piccione G. 2018. Interspecies comparison of daily total locomotor activity monitoring in different management conditions. *J. Vet. Behav.* 23: 97-100. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.11.002>.
61. Gilbert J, Davis FC. 2009. Behavioral effects of systemic transforming growth factor-alpha in Syrian hamsters. *Behav. Brain Res.* 198: 440-448. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.046.
62. Goldman B, Hall V, Hollister C, Reppert S, Roychoudhury P, Yellon S, Tamarkin L. 1981. Diurnal changes in pineal melatonin content in four rodent species: relationship to photoperiodism. *Biol. Reprod.* 24:778-783. doi: 10.1095/biolreprod24.4.778.
63. Golombek DA. 2007. *Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. 2ed. Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires. 424p.
64. Golombek DA, Rosenstein RE. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90: 1063-1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>.
65. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, Luo MJ, Tan JH. 2015. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PloS One*. 10: e0117503. doi: 10.1371/journal.pone.0117503.
66. González-Stagnaro C. 1984. Comportamiento reproductivo de las razas locales de rumiantes en el trópico americano. *Reproduction des Ruminants en Zone Tropicale*. Ed. INRA Publ. (20): 83 p.
67. Gooley JJ. 2016. Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 75:440-450. doi: 10.1017/S0029665116000288.
68. Gordon JG, McAllister IK. 1970. The circadian rhythm of rumination. *J. Agric. Sci.* 74:291-297.

DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600022905>.

69. Gorman MR, Lee TM. 2002. Hormones and Biological Rhythms. En: Becker JB, Marc Bredlove S, Crews D, McCarthy M, ed. Behavioral Endocrinology. 2nd ed. Cambridge, Massachusetts: A Bradford Book. p. 451–489.
70. Gotlieb N, Moeller J, Kriegsfeld. 2018. Development and modulation of female reproductive function by circadian signals. En: Wray S, Blackshaw S (eds.). Developmental Neuroendocrinology. Masterclass in Neuroendocrinology. Vol 9. Springer, Cham. pp 413-446. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40002-6_16.
71. Greco D. 2002. Endocrine glands and their function. En: Cunningham textbook of veterinary physiology, 3rd edn. WB. Saunders Company, Philadelphia, pp 341–372.
72. Harada N, Yoda Y, Yotsumoto Y, Masuda T, Takahashi Y, Katsuki Y, Kai K, Shiraki N, Inui H, Yamaji R. 2018. Androgen signaling expands beta-cell mass in male rats and beta-cell androgen receptor is degraded under high-glucose conditions. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314:E274–E286. doi: 10.1152/ajpendo.00211.2017.
73. Harada N. 2018. Role of androgens in energy metabolism affecting on body composition, metabolic syndrome, type 2 diabetes, cardiovascular disease, and longevity: lessons from a meta-analysis and rodent studies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82: 1667-1682. doi: 10.1080/09168451.2018.1490172.
74. Hatcher KM, Royston SE, Mahoney MM. 2020. Modulation of circadian rhythms through estrogen receptor signaling. *Eur. J. Neurosci.* 51: 217-228. doi: 10.1111/ejn.14184.
75. Hillman E, Schrader L, Mayer C, Gygax L. 2008. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal.* 2: 405-409. doi: 10.1017/S1751731107001279.
76. Huntington GB, Harmon DL, Richards CJ. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84:E14-E24. doi: 10.2527/2006.8413_suppl14x.
77. Iason GR, Sim DA, Foreman E, Fenn P, Elston DA. 1994. Seasonal variation of voluntary food intake and metabolic rate in three contrasting breeds of sheep. *Anim. Prod.* 58:381-387. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0003356100007327>.
78. Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR. 1999. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J. Endocrinol.* 162:289–300. doi: 10.1677/joe.0.1620289.
79. Janes AN, Weekes TEC, Armstrong DG. 1985. Insulin action and glucose metabolism in sheep fed on dried-grass or ground, maize-based diets. *Br. J. Nutr.* 54:459–471. doi: 10.1079/BJN19850131.
80. Jessen C, Kuhnen G. 1996. Seasonal variations of body temperature in goats living in an outdoor environment. *J. Therm. Biol.* 21: 197-204. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(96\)00004-6](https://doi.org/10.1016/0306-4565(96)00004-6).
81. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. 2003. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br. J. Pharmacol.* 138:733–744. doi:10.1038/sj.bjp.0705141.
82. Kalsbeek A, Strubbe JH. 1998. Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiol. Behav.* 63: 553–558. doi: 10.1016/s0031-9384(97)00493-9.
83. Kalsbeek A, Fliers E, Franke AN, Wortel J, Buijs RM. 2000. Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology.* 141:3832-3841. doi: 10.1210/endo.141.10.7709.
84. Kalsbeek A, la Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. 2004. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J. Neurosci.* 24:7604-7613. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5328-03.2004.

85. Kalyesubula M, Casey TM, Reicher N, Sabastian C, Wein Y, Shira EB, Hoang N, George UZ, Shamay A, Plaut K, Mabjeesh SJ. 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. *Small Rumin. Res.* 200: 106394. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106394>.
86. Kamba A, Daimon M, Murakami H, Otaka H, Matsuki K, Sato E, Tanabe J, Takayasu S, Matsuhashi Y, Yanagimachi M, Terui K, Kageyama K, Tokuda I, Takahashi I, Nakaji S. 2016. Association between higher serum cortisol levels and decreased insulin secretion in a general population. *PLoS One.* 11: e0166077. doi: 10.1371/journal.pone.0166077.
87. Katsu Y, Iguchi T. 2015. SUBCHAPTER 95D. Cortisol. *Handbook of Hormones Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. EDITED BY Yoshio Takei, Hironori Ando, Kazuyoshi Tsutsui. ISBN: 978-0-12-801028-0. Copyright©. Elsevier Inc.
88. Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. 2007. Emerging ideas about kisspeptin– GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.* 30:504-511. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.001.
89. Kelly DM, Jones TH. 2013. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* 217: R25–R45. doi: 10.1530/JOE-12-0455.
90. Kendall PE, Tucker CB, Dalley DE, Clark DA, Webster JR. 2008. Milking frequency affects the circadian body temperature rhythm in dairy cows. *Livest. Sci.* 117: 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.009>.
91. Kennaway DJ. 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 11: 91-101. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh054>.
92. Kerdelhue B, Brown S, Lenoir V, Queenan J TJ, Jones GS, Scholler R, Jones HWJ. 2002. Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology.* 75:158–163. doi: 10.1159/000048233.
93. Keskin M, Sahin A, Bicer O, Gul S, Kaya S, Sari A, Duru M. 2005. Feeding behaviour of Awassi sheep and Shami (Damascus) goats. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 29:435-439. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol29/iss2/36>.
94. Kieltyka-Kurc A, Rydel-Gigauri J, Górecki MT. 2013. Circadian activity of dairy ewes kept indoors. *Ann. Anim. Sci.* Vol. 13:55–62. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0058-7>.
95. Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K. 2005. Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J. Anim. Sci.* 83: 557-564. doi: 10.2527/2005.833557x.
96. Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ. 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science.* 294: 2511-2515. 10.1126/science.1067716.
97. Kräuchi K. 2002. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clin. Auton. Res.* 12: 147-149. doi: 10.1007/s10286-002-0043-9.
98. Kudielka BM, Kirschbaum C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol. Psychol.* 69: 113–132. doi: 10.1016/j.biopsycho.2004.11.009.
99. Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. 2015. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 872:99-126. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_5.
100. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. 2000. Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res.* 871:50-56. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02423-9.
101. Larsen TS, Nö N, Blix AS. 1985. Seasonal changes in lipogenesis in isolated adipocytes from Svalbard

- and Norwegian reindeer. *Acta Physiol. Scand.* 123:97–104. doi:10.1111/j.1748-1716.1985.tb07566.x
102. Lefcourt AM, Bitman J, Kahl S, Wood DL. 1993. Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 2607-2612. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77595-5.
103. Lefcourt AM, Huntington JB, Akers RM, Wood DL, Bitman J. 1999. Circadian and ultradian rhythms of body temperature and peripheral concentrations of insulin and nitrogen in lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 16: 41-55. doi: 10.1016/s0739-7240(98)00047-2.
104. Leon-Mercado L, Herrera D, Basualdo M, Kawata M, Escobar C, Buijs RM. 2017. The arcuate nucleus: a site of fast negative feedback for corticosterone secretion in male rats. *eNeuro.* 4: ENEURO.0350-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0350-16.2017.
105. Li H, Li K, Zhang K, Li Y, Gu H, Liu H, Yang Z, Cai D. 2021. The circadian physiology: implications in livestock health. *Int. J. Mol. Sci.* 22:2111. doi: 10.3390/ijms22042111.
106. Lincoln GA, Davidson W. 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J. Reprod. Fertil.* 49: 267-76. doi: 10.1530/jrf.0.0490267.
107. Lincoln GA, Peet MJ, Cunningham RA. 1977. Seasonal and circadian changes in the episodic release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. *J. Endocr.* 72: 337-349. doi: 10.1677/joe.0.0720337.
108. Lincoln GA, Almeida OFX, Klandorf H, Cunningham RA. 1982. Hourly fluctuations in the blood levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, triiodothyronine, thyroxine and cortisol in rams under artificial photoperiods, and the effects of cranial sympathectomy. *J. Endocrinol.* 92: 237-250. doi: 10.1677/joe.0.0920237.
109. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 76:1216–1231. DOI:10.2527/1998.7641216x.
110. López-Gatius F, Santolaria P, Mundet I, Yániz JL. 2005. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology.* 63: 1419-1429. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.007.
111. Lovick TA. 2012. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45: 314-320. doi: 10.1590/s0100-879x2012007500044.
112. Lowe TE, Cook CJ, Ingran JR, Harris PJ. 2001. Impact of climate on thermal rhythm in pastoral sheep. *Physiol. Behav.* 74: 659-664. doi: 10.1016/s0031-9384(01)00608-4.
113. Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 473-482. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78194-0.
114. Mackenzie G, Maguire J. 2014. The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABAA receptors in affective disorders. *Psychopharmacology (Berl.).* 231: 3333-3342. doi: 10.1007/s00213-013-3423-z.
115. Maloney SK, Meyer LCR, Blache D, Fuller A. 2013. Energy intake and the circadian rhythm of core body temperature in sheep. *Physiol. Rep.* 1: 1-9. doi: 10.1002/phy2.118.
116. Maloney SK, Marsch MK, McLeod SR, Fuller A. 2017. Heterothermy is associated with reduced fitness in wild rabbits. *Biol. Lett.* 13: 1-4. doi: 10.1098/rsbl.2017.0521.
117. McManus C, Dallago BSL, Lehugeur C, Ribeiro LA, Hermuche P, Guimarães RF, Júnior OA, Paiva SR. 2016. Patterns of heat tolerance in different sheep breeds in Brazil. *Small Rum. Res.* 144: 290-299. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.10.004>.
118. McMillen IC, Thorburn GD, Walker DW. 1987. Diurnal variations in plasma concentrations of

- cortisol, prolactin, growth hormone and glucose in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J. Endocrinol.* 144: 65-72. doi: 10.1677/joe.0.1140065.
119. Mendes AMP, Azevedo M, Lopes PMO, Moura GBA. 2014. Zoneamento bioclimático para a raça ovina Dorper no Estado de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.* 49:986-993. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014001200009>.
 120. Méndez-Hernández R, Escobar C, Buijs RM. 2020. Suprachiasmatic nucleus–arcuate nucleus axis: interaction between time and metabolism essential for health. *Obesity (Silver Spring)*. 28:S10-S17. doi: 10.1002/oby.22774.
 121. Mingoas JPK, Ngayam LL. 2009. Preliminary findings on vaginal epithelial cells and body temperature changes during oestrous cycle in Bororo zebu cow. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3: 147-151. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v3i1.42745>.
 122. Mitchell D, Snelling EP, Hetem RS, Maloney SK, Strauss WM, Fuller A. 2018. Revisiting concepts of thermal physiology: predicting responses of mammals to climate change. *J. Anim. Ecol.* 87: 956-973. DOI: 10.1111/1365-2656.12818.
 123. Miyatake A, Morimoto Y, Oishi T, Hanasaki N, Sugita Y, Iijima S, Teshima Y, Hishikawa Y, Yamamura Y. 1980. Circadian rhythm of serum testosterone and its relation to sleep: comparison with the variation in serum luteinizing hormone, prolactin, and cortisol in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 1365-1371. doi: 10.1210/jcem-51-6-1365.
 124. Mong JA, Cusmano DM. 2016. Sex differences in sleep: impact of biological sex and sex steroids. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 371: 20150110. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0110>.
 125. Montanholi NE, Odongo KC, Swanson FS, Schenke BW, McBride SP, Miller. 2008. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos taurus*). *J. Therm. Biol.* 33: 468-475. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2008.09.001>.
 126. Nikkhah A. 2011. Time of feed provision (2100 vs. 0900 h) orchestrates postprandial rhythms of food intake and peripheral glucose in lactating cows. *Biol. Rhythm Res.* 44: 33-44. DOI:10.1080/09291016.2011.632606.
 127. Nikkhah A. 2013. Chronophysiology of ruminant feeding behavior and metabolism: an evolutionary review. *Biol. Rhythm Res.* 44: 197–218. <https://doi.org/10.1080/09291016.2012.656437>.
 128. Niu M, Ying Y, Bartell PA, Harvatine KJ. 2017. The effects of feeding rations that differ in fiber and fermentable starch within a day on milk production and the daily rhythm of feed intake and plasma hormones and metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100: 187-198. doi: 10.3168/jds.2016-11129.
 129. NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington (DC): The National Academies Press.
 130. Ogawa S, Chan J, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. 2003. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology*. 144:230-239. doi: 10.1210/en.2002-220519.
 131. Ortavant R, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P. 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 7: 305-345.
 132. Ortêncio Filho H, Barbosa OR, Sakaguti ES, Onorato WM, Macedo F de AF. 2008. Efeito da sombra natural e da tosquia no comportamento de ovelhas das raças Texel, Hampshire Down, ao longo do período diurno, no Nordeste do Estado do Paraná. *Acta Sci. Anim. Sci.* 230: 981-993.
 133. Padilla SL, Perez JG, Ben-hamo M, Bussi IL, Palmiter RD, De Iglesia HO. 2019. Kisspeptin neurons

- in the arcuate nucleus of the hypothalamus orchestrate circadian rhythms and article kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus orchestrate circadian rhythms and metabolism. *Curr. Biol.* 29:592-604. doi: 10.1016/j.cub.2019.01.022.
134. Paranjpe DA, Sharma VK. 2005. Evolution of temporal order in living organisms. *J. Circadian Rhythms.* 3: 7. doi: 10.1186/1740-3391-3-7
135. Parraguez VH, Vergara M, Riquelme R, Raimann R, Llanos AJ, Seron-Ferré MS. 1989. Ontogeny of the circadian rhythm of cortisol in sheep. *Biol. Reprod.* 40: 1137-1143. doi: 10.1095/biolreprod40.6.1137.
136. Parry BL, Javeed S, Laughlin GA, Hauger R, Clopton P. 2000. Cortisol circadian rhythms during the menstrual cycle and with sleep deprivation in premenstrual dysphoric disorder and normal control subjects. *Biol. Psychiatry.* 48:920–931. doi: 10.1016/s0006-3223(00)00876-3.
137. Parsons AJ, Newman JA, Penning PD, Harvey A, Orr RJ. 1994. Diet preference of sheep: effect of recent diet, physiological state and species abundance. *J. Anim. Ecol.* 63: 465–478.
138. Penning PD, Parsons AJ, Orr RJ, Harvey A, Champion RA. 1995. Intake and behavioural response by sheep in different physiological states, when grazing monocultures of grass or white clover. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 45:63–78. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00602-O](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00602-O).
139. 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 Vet. Scand.* 39: 35–47. doi: 10.1186/BF03547805.
140. Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C. 2017. Comportamiento ingestivo y ambiente ruminal de ovinos alimentados únicamente con una pastura en estabulación o a pastoreo. *Veterinaria (Montevideo).* 54: 32-38.
141. Piccione G, Caola G, Refinetti R. 2002a. Circadian modulation of starvation-induced hypothermia in sheep and goats. *Chronobiol. Int.* 19:531–541. doi: 10.1081/cbi-120004225.
142. Piccione G, Caola G, Refinetti R. 2002b. The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biol. Rhythm Res.* 33: 113-119. <https://doi.org/10.1076/brhm.33.1.113.1322>.
143. Piccione G, Refinetti R. 2003. Thermal chronobiology of domestic animals. *Front. Biosci.* 8: 258-264. doi: 10.2741/1040.
144. Piccione G, Bertulucci C, Caola G, Foà A. 2007. Effects of restricted feeding on circadian activity rhythms of sheep - A brief report. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 107:233-238. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.10.008>.
145. Piccione G, Messina V, Giannetto C, Casella S, Assenza A, Fazio F. 2011. Seasonal variations of the serum proteins in sheep and goats (Short Communication). *Arch. Anim. Breed.* 54: 399–405. doi:10.5194/aab-54-399-2011.
146. Piccione G, Ganesella M, Morgante M, Refinetti R. 2013. Daily rhythmicity of core and Surface temperatures of sheep kept under thermoneutrality or in the cold. *Res. Vet. Sci.* 95: 261-265. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.03.005.
147. Piccione G, Giannetto C, Giudice E, Refinetti R. 2019. Persistent homeothermy in large domestic mammals maintained under standard farming conditions. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 14: doi: 10.1515/jbcpp-2018-0121.
148. Pinto-Santini L, Carreño J, Chacón T, Ruiz AZ, Landaeta-Hernández A. 2018. Rasgos de conducta y perfil hormonal durante los primeros 42 d de gestación en ovejas a pastoreo con disponibilidad de sombra. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* 59:28-38.
149. Recabarren SE, Vergara M, Llanos AJ, Serón-Ferré M. 1987. Circadian variation of rectal temperature in newborn sheep. *J. Dev. Physiol.* 9:399-408.

150. Refinetti R. 1994. Circadian modulation of ultradian oscillation in the body temperature of the golden hamster. *J. Therm. Biol.* 19: 269-275. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)90050-7).
151. Refinetti R. 2016. *Circadian Physiology*, Third edition, CRC Taylor & Francis Group.
152. Refinetti R. 2020. Circadian rhythmicity of body temperature and metabolism. *Temperature.* 7: 321–362. doi: 10.1080/23328940.2020.1743605.
153. Relling A, Mattioli, G. 2003. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Cátedra de Fisiología de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P. Editorial EDULP. Argentina 72pp.
154. Rietema SE, Blackberry MA, Maloney SK, Martin GB, Hawken PAR, Blache D. 2015. Twenty-four-hour profiles of metabolic and stress hormones in sheep selected for a calm or nervous temperament. *Domest. Anim. Endocrinol.* 53:78-87. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.05.005>.
155. Rodríguez-Cuenca S, Monjo M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P. 2007. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17-estradiol, testosterone, and progesterone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: E340 –E346. doi: 10.1152/ajpendo.00175.2006.
156. Roelofs JB, van Eerdenburg FJCM, Soede NM, Kemp B. 2005. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology.* 64:1690-703. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.004.
157. Roland L, Drillich M, Klein-Jöbstl D, Iwersen M. 2016. Invited review: Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves. *J. Dairy Sci.* 99: 2438-2452. doi: 10.3168/jds.2015-9901.
158. Rottman LW, Ying Y, Zhou K, Bartell PA, Harvatine KJ. 2014. The daily rhythm of milk synthesis is dependent on the timing of feed intake in dairy cows. *Physiol. Rep.* 2: 1-12. doi: 10.14814/phy2.12049.
159. Sano H, Narahara S, Kondo T, Takahashi A, Terashima Y. 1993. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows. *Dom. Anim. Endocrinol.* 10:191–197. doi: 10.1016/0739-7240(93)90023-5.
160. Sarout BNM, Waterhouse A, Duthie CA, Poli CH, Haskell MJ, Berger A, Umstatter C. 2018. Assessment of circadian rhythm of activity combined with random regression model as a novel approach to monitoring sheep in an extensive system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 207: 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.06.007>.
161. Schwartz WJ, Reppert SM. 1985. Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 5:2771-2778. doi: 10.1523/JNEUROSCI.05-10-02771.1985.
162. Scolari SC, Clark SG, Knox RV, Tamassia MA. 2011. Vulvar skin temperature changes significantly during estrus in swine as determined by digital infrared thermography. *JSHAP.* 19:151–155.
163. Selmaoui B, Touitou Y. 2003. Reproducibility of the circadian rhythms of serum cortisol and melatonin in healthy subjects: a study of three different 24-h cycles over six weeks. *Life Sci.* 73: 3339-3349. doi: 10.1016/j.lfs.2003.05.007.
164. Sherman GD, Lerner JS, Josephs RA, Renshon J, Gross JJ. 2016. The interaction of testosterone and cortisol is associated with attained status in male executives. *J. Pers. Soc. Psychol.* 110:921-929. doi: 10.1037/pspp0000063.
165. Silanikove N. 1987. Impact of shelter in hot Mediterranean climate on feed intake, feed utilization and body fluid distribution in sheep. *Appetite.* 9: 207–215. doi:10.1016/S0195-6663(87)80014-4.
166. Silver R, Rainbow M. 2013. The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body. In: Pfaff, D.W. (eds) *Neuroscience in the 21st Century*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_66.

167. Solórzano-Montilla J, Pinto-Santini L, Camacaro-Calvete S, Vargas-Guzmán D, Ríos-de-Álvarez L. 2018. Effect of the presence of shade in sheep grazing areas. 2. Animal activity. *Pastos y Forrajes*. 41: 39-46.
168. Sosa C, Forcada F, Meikle A, Abecia JA. 2013. Increase in ovine plasma cortisol at oestrus and its relation with the metabolic status during the sexual cycle in sheep. *Biol. Rhythm Res*. 44 (2013), <https://doi.org/10.1080/09291016.2012.704793>.
169. Srikanthan P, Karlamangla AS. 2011. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 96:2898-2903. doi: 10.1210/jc.2011-0435.
170. SUL (Secretariado Uruguayo de la Lana). 2022. Boletín Mensual de Exportaciones del Rubro Ovino. <https://www.sul.org.uy/mercados/export>.
171. Sutton CM, Alexander BM. 2019. Ewes express increased proceptive behavior toward high-sexually active rams. *Appl. Anim. Behav. Sci*. 216: 15-18. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.04.013>.
172. Taweel HZ, Tas BM, Dijkstra J, Tamminga S. 2004. Intake regulation and grazing behavior of dairy cows under continuous stocking. *J. Dairy Sci*. 87:3417–3427. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73477-3.
173. Tenover JS, Matsumoto AM, Clifton DK, Bremner WJ. 1988. Age-related alterations in the circadian rhythms of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in healthy men. *J. Gerontol*. 43:M163-169. doi: 10.1093/geronj/43.6.m163.
174. Thun R, Eggenberger E, Zerobin Z, Luscher T, Vetter W. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*. 109:2208-2212. doi: 10.1210/endo-109-6-2208.
175. Tilbrook AJ, Canny BJ, Serapiglia MD, Ambrose TJ, Clarke IJ. 1999. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. *J. Endocrinol*. 160: 469–481. doi: 10.1677/joe.0.1600469.
176. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals. The role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod*. 5: 105–113. doi: 10.1530/ror.0.0050105.
177. Turner AI, Canny BJ, Hobbs RJ, Bond JD, Clarke IJ, Tilbrook AJ. 2002. Influence of sex and gonadal status of sheep on cortisol secretion in response to ACTH and on cortisol and LH secretion in response to stress: importance of different stressors. *J. Endocrinol*. 173: 113–122. doi: 10.1677/joe.0.1730113.
178. Ungerfeld R. 2012. Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and milchschaft rams. *Anim. Prod. Sci*. 52:1036–1041. doi:10.1071/AN12114.
179. Ungerfeld R, Clemente N, Orihuela A. 2018. Treatments with eCG and courtship behaviour in rams during the breeding and the non-breeding seasons. *Anim. Prod. Sci*. 59: 865-869. <https://doi.org/10.1071/AN17728>.
180. Ungerfeld R, Freitas-de-Melo A. 2019. Stress and behavioural responses to winter shearing differ between pregnant and non-pregnant ewes. *Physiol. Behav*. 210: 12653. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112653.
181. Ungerfeld R, Viera MN, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Casuriaga D, Silveira P. 2021. Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Anim. Reprod. Sci*. 226:106719. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106719.
182. Valera S, Ballivet M, Bertrand D. 1992. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89. PMID: 1409725.
183. Valtorta SE, Gallardo MR. 1996. El estrés por calor en producción lechera. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Ed.). 81 Miscelánea. pp. 173–185.

184. van der Veen DR, Riede SJ, Heideman PD, Hau M, van der Vinne V, Hut RA. 2017. Flexible clock systems: adjusting the temporal programme. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 372: 20160254. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0254>.
185. van Lier E, Carriquiry M, Meikle A. 2014. Sex steroid modulation of cortisol secretion in sheep. *Animal.* 8: 960–967. doi: 10.1017/S1751731114000780.
186. Varadarajan S, Tajiri M, Jain R, Holt R, Ahmed Q, LeSauter J, Silver R. 2018. Connectome of the suprachiasmatic nucleus: new evidence of the core-shell relationship. *eNeuro.* 5: ENEURO.0205-18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0205-18.2018.
187. Vida B, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Coen CW, Liposits Z, Kalló I. 2008. Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *J. Neuroendocrinol.* 20:1270–1277. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01787.x.
188. Vizzotto EF, Fischer V, Thaler Neto A, Abreu AS, Stumpf MT, Werncke D, Schmidt FA, McManus CM. 2015. Access to shade changes behavioral and physiological attributes of dairy cows during the hot season in the subtropics. *Animal.* 9:1559–1566. doi:10.1017/S1751731115000877.
189. Wang M, Alves J, Tucker M, Yang W, Ruckstuhl KE. 2018. Effects of intrinsic and extrinsic factors on ruminating, grazing, and bedding time in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Plos One.* 13(10): e0206664. doi:10.1371/journal.pone.0206664.
190. Wagner N, Mialon MM, Sloth KH, Lardy R, Ledoux D, Silberberg M, des Roches A, Veissier I. 2021. Detection of changes in the circadian rhythm of cattle in relation to disease, stress, and reproductive events. *Methods.* 186: 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.09.003>.
191. Webb IC, Antle MC, Mistlberger, R. 2014. Regulation of circadian rhythms in mammals by behavioral arousal. *Behav. Neurosci.* 128: 304-325. doi: 10.1037/a0035885.
192. Welsh TH, Johnson BH. 1981. Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in bulls. *Endocrinology.* 109: 185–190. doi: 10.1210/endo-109-1-185.
193. Wollnik F, Turek F. 1988. Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiol. Behav.* 43:389-396. doi: 10.1016/0031-9384(88)90204-1.
194. Wright KP, McHill AW, Birks BR, Griffin BR, Rusterholz T, Chinoy ED. 2013. Entrainment of the human circadian clock to the natural light-dark cycle. *Curr. Biol.* 23: 1554-1558. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.039.
195. Yan L, Silver R. 2016. Neuroendocrine underpinnings of sex differences in circadian timing systems. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160: 118-126. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.10.007.
196. Yildiz O, Seyrek M. 2007. Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 115:1–6. doi:10.1055/s-2007-949657.
197. Zhang C, Tu Y, Ma T, Diao Q. 2022. Connection between circadian rhythm and rumen digestibility of concentrate and roughage in sheep. *Agriculture.* 12: 2152. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122152>.

10. PUBLICACIONES