

Inducción de la actividad ovárica en yeguas criollas con un programa de fotoperiodo artificial en la latitud 19°9'N

Induction of ovarian activity with artificial photoperiod in criollo mares located at 19°9'N

Luna María López Pérez* Luis Zarco Quintero* Ana Myriam Boeta Acosta*

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of an artificially long photoperiod of 16 h of light and eight h of darkness on the length of the seasonally anovulatory period and the duration of the transitional period to ovarian activity in Criollo mares, located at 19° 9'N latitude. Twenty two adult Criollo mares, from three to 17 years old, were randomly divided in two groups. The animals on the experimental group (n = 14) were exposed to 16 h of light per day during four months from December to March. The control mares (n = 8) were exposed only to the natural photoperiod in open pens. The interval from the beginning of the artificial light treatment (December 1) to the first ovulation of the year in the experimental group was 88.4 ± 3.6 days and for the control group, 137.2 ± 15.0 days ($P < 0.01$); the interval between the development of the first follicle larger than 30 mm and the first ovulation (vernal transition) was 30.9 ± 2.2 days for the experimental group and 37.6 ± 6.6 days for the control group, this difference was not significant ($P > 0.05$). The mean diameter of the largest follicle increased gradually from week seven in the experimental group and from week 13, in the control group. Mares from both groups showed anovulatory estrus during the anovulatory season as well as during the transitional period. In the majority of the cases, estrous periods were irregular. The results indicate that exposure to an artificially photoperiod of 16 h of light and eight h of darkness, advances the onset of the vernal transition and the first ovulation in Criollo mares located at latitudes that are relatively close to the equator (19° 9'N); therefore, it can be used to anticipate the beginning of a reproductive program.

Key words: OVARIAN ACTIVITY, PHOTOPERIOD, MARES, ANOVULATORY SEASON, CRIOLLO MARES.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto de un fotoperiodo artificial de 16 horas de luz y ocho de oscuridad sobre la longitud del periodo anovulatorio y la duración del periodo de transición hacia la época ovulatoria en yeguas criollas, localizadas en la latitud 19° 9'N. Se utilizaron 22 yeguas criollas de tres a 17 años de edad, que fueron divididas al azar en dos grupos. Las yeguas del grupo experimental (n = 14) se mantuvieron bajo un programa de fotoperiodo artificial de 16 horas de luz por día durante cuatro meses, de diciembre a marzo. Las yeguas del grupo testigo (n = 8) se mantuvieron en condiciones de luz natural. El intervalo desde el inicio del tratamiento luminoso (1 de diciembre) a la primera ovulación del año en el grupo experimental fue de 88.4 ± 3.6 días, y para el grupo testigo fue de 137.2 ± 15.0 días ($P < 0.01$); la duración del periodo de transición invernal (intervalo entre el desarrollo del primer folículo mayor a 30 mm y la primera ovulación) fue de 30.9 ± 2.2 días para el grupo experimental y 37.6 ± 6.6 para el grupo testigo, esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). El diámetro folicular promedio aumentó paulatinamente a partir de la semana siete en el grupo experimental y de la semana 13 en el grupo testigo. En ambos grupos se presentaron estros anovulatorios durante la época de anestro y durante la época de transición. Los intervalos entre estros fueron irregulares en su mayoría. Los resultados indicaron que en latitudes relativamente cercanas al ecuador (19° 9'N) la exposición de yeguas criollas a un fotoperiodo artificial de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad adelanta el inicio de la etapa de transición y de la etapa ovulatoria, por lo que puede ser utilizado para anticipar el inicio del programa reproductivo.

Palabras clave: ÉPOCA OVULATORIA, FOTOPERIODO, YEGUAS, TEMPORADA ANOVULATORIA, YEGUAS CRIOLLAS.

Recibido el 12 de junio de 2009 y aceptado el 12 de febrero de 2010.

*Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

From a reproductive standpoint, the mare is a seasonally polyestric species, with ovarian activity during spring-summer and a sexually quiescent period during autumn and winter. This reproductive seasonality is regulated by changes in the duration of the daily light period (photoperiod), although it can be modulated by temperature and feed availability.^{1,3}

The circannual reproductive rhythm in horses, as in most species, is mainly regulated by photoperiod. The animals perceive changes in the daily duration of sun light, which indicates them the season of the year in which they stand.⁴ To do that, the light signal is transformed into endocrine signals through interactions between the pineal gland, the hypothalamus, the pituitary gland and the gonads, resulting in regulation of the reproductive physiology. Ovarian activity increases as the duration of photoperiod increases, until, in the northern hemisphere, a regular cyclic pattern is established between April and September (reproductive or ovulatory season), when the duration of day length is maximal. Thereafter, ovarian activity is reduced as day length starts to decrease, and may even cease to occur from November to January (anovulatory season), when the days are shortest.^{3,4} In the southern hemisphere the ovulatory and anovulatory seasons are inverted because the duration of the day is also inverted with respect to the northern hemisphere.

The regulatory effect of photoperiod on reproductive seasonality is more evident at high latitudes, both south and north of the equatorial line. However, a clear anovulatory season is maintained even at latitudes that are relatively close to the equator (i.e. between 15° and 22° N) even though the difference between the shortest and the longest day is only about two hours.^{5,6}

The characteristics of specific equine populations, coupled to the economic interests associated with breeding programs designed to maximize the use of superior genetics and to get mares foaling as soon as possible after January 1st, has led to the development of reproductive programs aimed to advance the onset of the reproductive season, by means of shortening the period of transition between the anovulatory and the ovulatory seasons.^{5,7} For this purpose, several treatments have been designed that use hormones such as GnRH or progesterone, other substances like dopamine antagonists, and artificial lighting regimes.^{7,8}

Several studies have demonstrated the efficacy of artificial photoperiod programs to advance the onset of the ovulatory season in seasonally anestrous mares.^{1,9-12} Diverse artificial photoperiod aimed to reduce the duration of the transition to reproductive activity programs, have been evaluated at different latitudes on both hemispheres.⁹⁻¹²

Introducción

Desde el punto de vista reproductivo, la yegua es una especie poliéstrica estacional con actividad ovárica en la época de primavera-verano y un periodo de quiescencia sexual en otoño e invierno. Esta estacionalidad reproductiva de la yegua está regulada principalmente por los cambios en la duración del periodo de luz de cada día (fotoperiodo), aunque puede ser modulada por la temperatura y la disponibilidad del alimento.^{1,3}

El ritmo circanual de la reproducción en los caballos, como en la mayoría de las especies, está regulado principalmente por el fotoperiodo. Los animales perciben los cambios en la duración diaria de la luz solar, lo que les indica la época del año en la que se encuentran.⁴ Para ello, la señal luminosa es transformada en señales endocrinas por medio de la glándula pineal, que interactúa con el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, para regular las etapas de la fisiología reproductiva. La actividad ovárica aumenta conforme se incrementan las horas luz, hasta alcanzar, en el hemisferio Norte, un patrón cíclico regular entre abril y septiembre (temporada reproductiva o época ovulatoria), que corresponden con el periodo de mayor longitud del día. Posteriormente, la actividad ovárica se reduce conforme disminuye la duración de la luz diaria, hasta llegar a cesar durante noviembre a enero (temporada anovulatoria), cuando los días son más cortos.^{3,4} En el hemisferio Sur las temporadas reproductiva y de anestro se invierten debido a que la longitud del día también sigue un patrón opuesto al del hemisferio Norte.

El control del fotoperiodo en la estacionalidad reproductiva es más evidente en las latitudes altas, ya sea al Norte o al Sur del ecuador. Sin embargo, aun en latitudes relativamente cercanas al ecuador (por ejemplo, entre la latitud 15° y la latitud 22° N), se presenta una clara época anovulatoria a pesar de que la diferencia entre la duración del día más largo y el día más corto es de tan sólo dos horas.^{5,6}

Las características de una población equina específica, en conjunto con los intereses económicos asociados con los programas de reproducción que se realizan para maximizar el uso de genética superior y para facilitar los nacimientos de potros tan cerca del 1 de enero como sea posible, han provocado el desarrollo de programas de reproducción enfocados a acelerar el inicio de la etapa reproductiva, acortando la duración del periodo de transición entre la época de anestro y la de actividad ovárica cíclica plena.^{5,7} Con este fin se han utilizado varios tratamientos que incluyen hormonas como GnRH y progesterona, otras sustancias como los antagonistas de dopamina D2 y otras, así como programas de luz artificial.^{7,8}

Studies on seasonality of different equine breeds have been conducted at various Mexican locations and latitudes (15°-22° N), using both live animals and slaughterhouse specimens.^{12,13} Exposure to artificial photoperiod has also been evaluated in Thoroughbred mares, in which a clear shortening of the anovulatory season was observed in mares exposed to additional light, achieving conception rates of 53.5% during February and March.¹¹ However, the response of Criollo mares to artificial photoperiod could be different from that of Thoroughbred mares, since Boeta *et al.*,⁶ found that Criollo mares kept on natural photoperiod show much less reproductive seasonality than that found by other authors on Thoroughbred mares at the same latitude.^{11,13} Up to the present it is not known whether the reproductive seasonality of Criollo mares can be manipulated through exposure to artificial photoperiod. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of exposure to artificial photoperiod on the length of the anovulatory period and the duration of the period of transition to ovarian activity in Criollo mares located in Chalco, Estado de Mexico (19° 9'N).

Material and methods

The study was conducted in Chalco, Estado de Mexico, at a latitude of 19° 9'N, and 2 203 masl. Twenty two non-pregnant Criollo mares of various ages (three to 17 year old) were used. The mares were fed according to their requirements with alfalfa, oat hay, commercial concentrate and green pasture. They had *ad libitum* access to water. The body condition at the onset of the study varied from 5 to 6 (on a 1 to 9 scale) and by the end of the study had increased to 7 or 8.

The mares were randomly assigned in two groups that were balanced according to age. The control group (n = 8) was kept in open pens with a small shadow area and were exposed to natural photoperiod throughout the study. The experimental group (n = 14) was kept in the same type of pen, but artificial light was provided in such a way as to complete 16 h per day of exposure to light (natural + artificial) from the first day of the experiment (December 1st) until March 15th. Artificial light was provided by 14 lamps of 150 watts each, that were placed on top of 2.5 m poles, covering an area of 568.8 m². The lamps were connected to an automatic timer that turned them on at 5:00 pm and off at 11:00 pm.

The mares were teased with an intact male on alternate days in order to detect signs of estrus. Follicular activity was monitored by trans-rectal ultrasound using an Aloka 210 equipment with a 5 MHz linear probe, once per week during December, and two to three times per week from the first week

Varios estudios han demostrado la eficacia de los programas de fotoperiodo artificial para adelantar el inicio de la estación de actividad ovárica en yeguas en anestro estacional.^{1,9-12} En diferentes latitudes de ambos hemisferios se han realizado estudios para evaluar diversos programas de fotoperiodo artificial enfocados a disminuir la duración del periodo de transición hacia la época reproductiva.⁹⁻¹²

En México se han realizado estudios de la estacionalidad reproductiva de diferentes razas de yeguas en distintas latitudes (15°-22° N), usando para ello tanto animales vivos como material de rastro.^{12,13} También se han evaluado los efectos de la exposición a fotoperiodo artificial en yeguas Pura Sangre Inglés, en las que se ha observado notorio acortamiento de la época anovulatoria en los casos en que se aplicó luz adicional, obteniendo rangos de concepción en febrero y marzo de hasta 53.5%.¹¹ Sin embargo, la respuesta de las yeguas criollas al fotoperiodo artificial podría ser diferente que las de las yeguas Pura Sangre Inglés, ya que Boeta *et al.*,⁶ encontraron que las yeguas criollas expuestas a fotoperiodo natural presentan mucho menos estacionalidad reproductiva que la encontrada por otros autores en yeguas Pura Sangre Inglés en la misma latitud.^{11,13} Hasta el momento no se conoce si la estacionalidad reproductiva de las yeguas criollas mexicanas es susceptible de ser manipulada con fotoperiodo artificial, por lo que el objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de la exposición a fotoperiodo artificial sobre la longitud del periodo anovulatorio y la longitud del periodo de transición hacia la estación ovulatoria en yeguas criollas localizadas en Chalco, Estado de México (19° 9'N).

Material y métodos

El estudio se realizó en Chalco, Estado de México, México, latitud 19° 9'N, 2 203 msnm. Se utilizaron 22 yeguas vacías de raza criolla con edades variables (tres a 17 años). La alimentación consistió en heno de avena, alfalfa, concentrado y pastoreo en pasto verde. El agua se ofreció *ad libitum*. La condición corporal de las yeguas de ambos grupos al inicio del estudio oscilaba entre 5 y 6 (escala de 1 a 9) y al término del estudio estaba entre 7 y 8.

Las yeguas se dividieron aleatoriamente en dos grupos balanceados de acuerdo con la edad de los animales: Las yeguas del grupo testigo (n = 8) fueron alojadas en corrales con una pequeña área de sombra, estuvieron expuestas al fotoperiodo natural durante el estudio. El grupo experimental (n = 14) fue expuesto a un programa de luz artificial con el que se lograba un periodo diario de exposición a luz (natural + artificial) de 16 horas diarias desde el inicio del tratamiento (1

of January until the appearance of the first *corpus luteum* (CL) for each mare. The observed follicles were classified as small (< 15 mm), medium-sized (16-30 mm) and large (> 30 mm).⁶

All the mares were bled (10 mL) by jugular puncture one or two times per week to monitor ovarian activity.¹⁴ The blood samples were centrifuged at 1000 *g* for 20 minutes within one h after collection. The serum was separated and kept frozen at -20°C until assayed for progesterone concentrations, that were measured by a commercial solid-phase radioimmunoassay* at the endocrinology lab of the Departamento de Reproduccion Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Universidad Nacional Autonoma de Mexico). The dilutions used were 1:40 and the sensitivity of the assay was 0.02 ng/mL. The inter-assay variation coefficient varied from 4.03 to 5.16 %.

The presence of a functional CL was assumed when the progesterone concentrations were ≥ 1 ng/mL on at least two consecutive samples.

The effect of artificial photoperiod on follicular development, the duration of the transition period and the interval from the beginning of the experiment to the first ovulation were evaluated by analysis of variance.

Results

Figure 1 summarizes the ovarian and behavioral activity of the control mares throughout the study. The dark bars indicate the periods when individual mares maintained regular ovarian activity, characterized by periods of high progesterone concentrations indicative of the presence of a functional CL, interrupted by low-progesterone periods of no more than two weeks of duration, indicative of the follicular phase of the ovarian cycle. The light bars indicate the periods of transition towards the ovulatory season, characterized by the development of large follicles (≥ 30 mm in diameter) that were not followed by increases in progesterone concentrations indicative of ovulation. The periods of overt estrus signs are indicated by "X". Light arrows indicate the first ovulation of the season and dark arrows indicate all other ovulations. As can be seen, all the mares in the control group had an anovulatory period of varied duration that started between November and January and ended between April and June. Anovulatory estrus occurred on 87.5% (7/8) of the mares. In all the animals both the first ovulation of the ovulatory season and the subsequent ovulations were accompanied by estrus signs.

Figure 2 presents the summarized report of the mares from the experimental group. It can be seen that most mares had their first ovulation during February.

de diciembre) hasta el 15 de marzo. La aplicación del fotoperiodo artificial (16L:8D) se logró a través de 14 reflectores de 150 watts colocados en postes a una altura de 2.50 m, con los que se cubría un área de 568.8 m². Los reflectores estaban conectados a un sistema de encendido automático que se activaba a las 5:00 pm y se apagaba a las 11:00 pm.

Las yeguas fueron receladas con un garañón cada tercer día, para observar signos de estro. La actividad folicular fue controlada transrectalmente con un ultrasonido Aloka 210 con transductor lineal de 5 MHz una vez por semana, durante el mes de diciembre, y dos o tres veces por semana desde la primera semana de enero hasta la aparición del primer cuerpo lúteo. Los folículos se clasificaron en pequeños (< 15 mm), medianos (16-30 mm) y grandes (> 30 mm).⁶

Todas las yeguas fueron sangradas de la vena yugular (10 mL) por punción de la vena yugular una o dos veces por semana para evaluar la función ovárica.¹⁴ Las muestras sanguíneas se centrifugaron (1 000 *g* por 20 min) una hora después de su obtención. Se separó el suero y se mantuvo congelado a -20°C hasta el ensayo para la determinación de progesterona. Las concentraciones de progesterona se determinaron mediante radioinmunoensayo en fase sólida con un kit comercial,* en el laboratorio del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las diluciones utilizadas fueron 1:40 y la sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/mL. El coeficiente de variación interensayos fue de 4.03% y 5.16%.

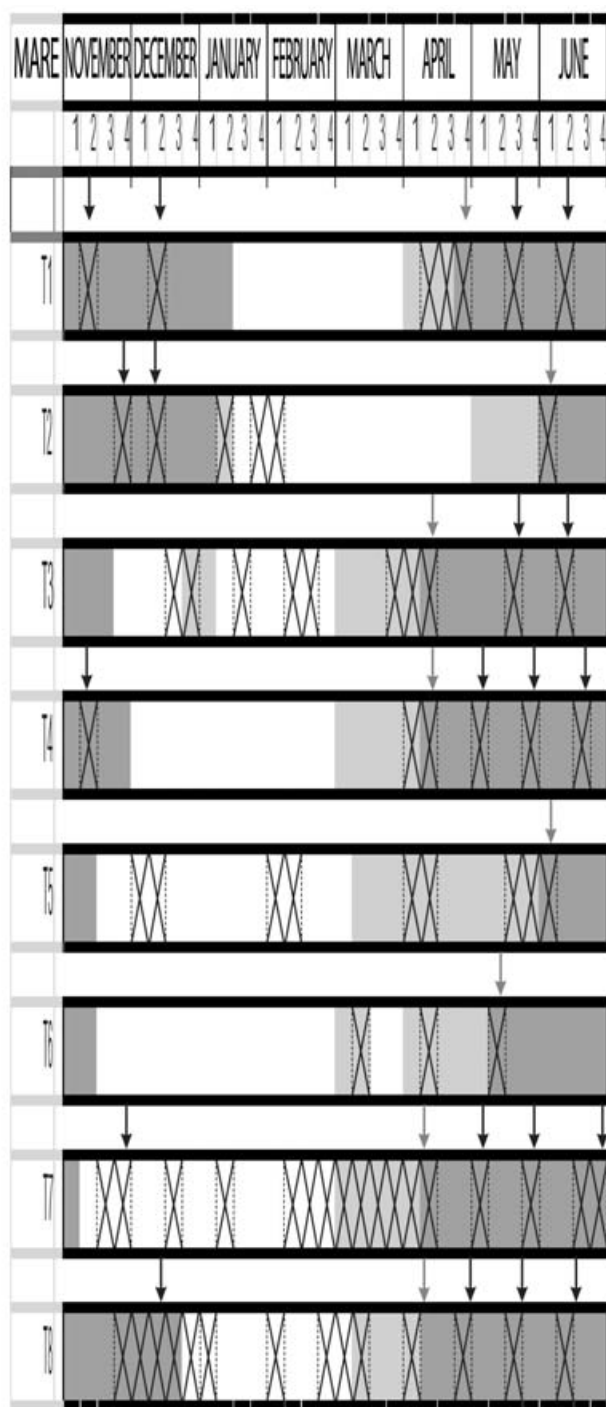
Cuando las concentraciones de progesterona fueron iguales o mayores a 1 ng/mL en por lo menos dos muestras sanguíneas consecutivas, se asumía la presencia de un cuerpo lúteo funcional formado como resultado de una ovulación.

El efecto del fotoperiodo artificial sobre el desarrollo folicular, la duración del periodo de transición y los días transcurridos desde el inicio del experimento hasta la ovulación fueron examinados mediante análisis de varianza.

Resultados

En la Figura 1 se resume la actividad ovárica y conductual de las yeguas del grupo testigo durante el periodo del estudio. Las barras de tono oscuro indican los periodos durante los cuales las yeguas mantenían actividad ovulatoria regular, caracterizada por periodos con concentraciones elevadas de progesterona, que indican la presencia de un cuerpo lúteo funcional,

*Coat-A-Count® Progesterona, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, Estados Unidos de América.



Anovulatory estrus was present in 100% (14/14) of the mares. These mares developed large follicles that did not reach ovulation. These type of persistent follicles appeared before in the experimental group (December to February) as compared to the control group (March to May).

Figure 3 shows the distribution of the control mares according to the size of the largest follicle recorded each month. During January, February and March only one or two mares developed large follicles

Figura 1. Representación semanal del periodo de anestro y actividad ovárica en las yeguas del grupo testigo.

■Representa el periodo de actividad ovárica después de la primera ovulación del año.
 ■Representa el periodo de desarrollo folicular previo a la primera ovulación del año.
 ⊗Representa los periodos de estrus
 ←Indica la primera ovulación del año
 ←Indica las subsecuentes ovulaciones

Figure 1. Weekly occurrence of estrus behavior and ovarian activity in the mares of the control group.

■Periods with cyclic ovarian activity.
 ■Periods with development of large follicles not followed by ovulation
 ⊗Periods of behavioral estrus
 ←First ovulation of the year
 ←Ovulations.

e interrumpidas por periodos de progesterona baja de no más de dos semanas de duración (compatible con la fase folicular del ciclo). Las barras de tono claro indican periodos de transición hacia la época ovulatoria durante los cuales se desarrollaban folículos de diámetro igual o mayor a 30 mm de diámetro, sin que se registraran concentraciones de progesterona indicativas de ovulación. Las "X" indican periodos de manifestación de signos de estrus. Las flechas claras señalan la primera ovulación de la época ovulatoria, y las flechas oscuras indican otro tipo de ovulaciones.. Se observa que todas las yeguas del grupo testigo tuvieron un periodo anovulatorio de duración variable que se inició entre noviembre y enero, y concluyó entre abril y junio. El 87.5% de las yeguas (7/8) presentaron estros anovulatorios. En todos los animales tanto la primera ovulación de la época ovulatoria como las ovulaciones subsecuentes estuvieron acompañadas de signos de estrus.

En la Figura 2 se presenta la información resumida de las yeguas del grupo experimental. La mayoría de las yeguas de este grupo presentaron su primera ovulación durante febrero. El 100% de las yeguas (14/14) presentaron estros sin ovulación, hubo presencia de folículos grandes que no llegaban a ovular. Sin embargo, dichos folículos persistentes se presentaron antes en el grupo experimental (diciembre a febrero) que en el grupo testigo (marzo a mayo).

En la Figura 3 se muestra la distribución de las yeguas del grupo testigo de acuerdo con el tamaño del folículo más grande observado en los ovarios cada mes. Durante enero, febrero y marzo solamente una o dos yeguas desarrollaron folículos grandes, y más de la mitad de las yeguas desarrollaron folículos pequeños. En marzo se produjo un súbito incremento en el porcentaje de yeguas que desarrollaron folículos grandes, y en abril todas menos una desarrollaron folículos grandes.

En la Figura 4 se muestra la distribución de las yeguas del grupo experimental. Se observa que a partir de enero aumentó el porcentaje de yeguas con folículos grandes, y durante febrero, marzo y abril la

and more than half of the mares developed only small follicles. In March there was a sudden increase in the proportion of mares developing large follicles, and by April all the control mares but one had developed large follicles.

Figure 4 shows the distribution of the experimental mares. It can be observed that starting on January the percentage of mares with large follicles increased, and by February, March and April most mares were developing large follicles, many of which reached ovulation.

Figure 5 shows the average diameter of the largest follicle present in each mare during each week of the study. In the control group the largest follicles initially had diameters around 15 mm, increasing to 25 mm in March and April and to 30 mm in May. In contrast, in the experimental group the largest follicles had reached an average size of 40 mm in January, decreasing thereafter to adopt a three to four-week cyclic pattern. During most of January and February the mean diameter of the largest follicle in the experimental group was significantly larger than that in the control group ($P < 0.05$).

As shown in Table 1, the mares in the experimental group ovulated significantly earlier than the control mares ($P < 0.05$). There were no differences between groups in the length of the interval between the appearance of the first large follicle and the occurrence of ovulation. The anovulatory period was shorter than 100 days in 25% of the control mares and in 79% of the experimental animals, the difference being significant ($P < 0.05$). One mare of the experimental group never stopped showing cyclic ovulatory activity.

During the anovulatory period, most mares of both groups experienced periods in which they responded to teasing with one or more estrus signs (clitoral eversion, urination in a squatting position, vocalization, interest in the male and positive lordosis), even though they had no large ovarian follicles. This anovulatory estrus occurred at irregular intervals, with an average duration of 12 days (Figures 1 and 2).

During the transitional period the animals in both groups showed estrus periods associated with the presence of large anovulatory follicles. The first ovulation was preceded by the presence of a large follicle during two or more weeks and by the expression of estrus behavior.

Figure 6 shows the temporal pattern of the resumption of ovarian activity in both groups. One mare of the experimental group always maintained cyclic activity; In the rest of them the first ovulations started to occur in the first week of February, when the mares had been exposed to artificial photoperiod for nine weeks. Five weeks later, all the mares in this group had experienced their first ovulation. In contrast, in

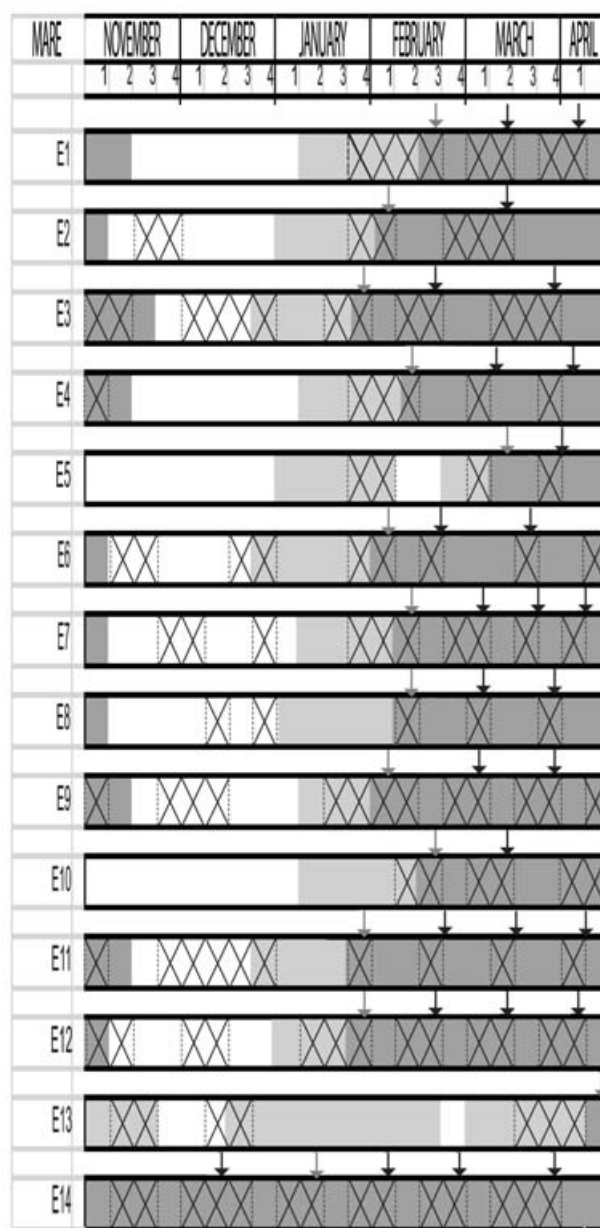


Figura 2. Representación semanal del periodo de anestro y actividad ovárica en las yeguas del grupo experimental.

■ Representa el periodo de actividad ovárica después de la primera ovulación del año.
 ■ Representa el periodo de desarrollo folicular previo a la primera ovulación del año.
 ⊗ Representa los periodos de estrus
 ← Indica la primera ovulación del año
 ← Indica las subsecuentes ovulaciones

Figure 2. Weekly occurrence of estrus behavior and ovarian activity in the mares of the experimental group

■ Periods with cyclic ovarian activity.
 ■ Periods with development of large follicles not followed by ovulation
 ⊗ Periods of behavioral estrus
 ← First ovulation of the year
 ← Ovulations.

mayoría de las yeguas desarrollaron folículos grandes, de los cuales muchos ovularon.

the control group the first ovulations occurred in April, 19 weeks after the onset of the experiment, and seven more weeks had to pass before all the mares in the control group had experienced their first ovulation..

Discussion

This study was conducted at a location (19°N) where the total variation in the length of photoperiod throughout the year amounts to only two h.¹² Several studies have suggested that reproductive seasonality in the mare decreases at latitudes where the change in day length along the year is small.¹⁵ However, the results of the present study indicate that criollo mares located at 19°N do have a seasonal pattern of reproductive activity that is regulated by photoperiod; thus, it can be modified by exposure to artificial photoperiod.

Most mares in the control group experienced a seasonal pattern very similar to what has been reported at latitudes with larger variations in photoperiod along

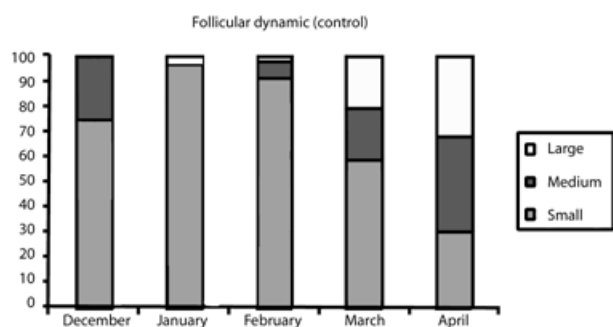


Figura 3. Porcentaje de yeguas del grupo testigo en las que el folículo más grande detectado durante cada mes fue clasificado como pequeño (menor a 15 mm), mediano (15 a 30 mm) o grande (mayor a 30 mm).

Figure 3. Percentage of control mares in which the largest follicle detected each month was classified as small (less than 15 mm), medium-sized (15 to 30 mm) or large (more than 30 mm).

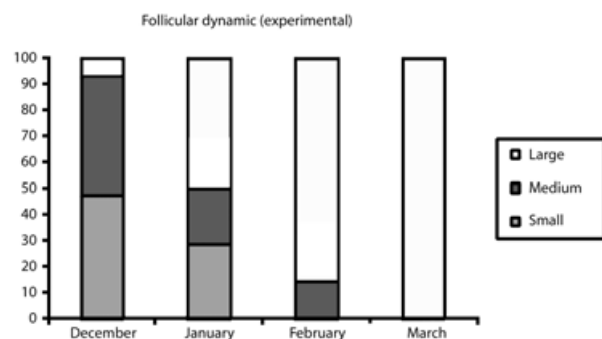


Figura 4. Porcentaje de yeguas del grupo experimental en las que el folículo más grande detectado durante cada mes fue clasificado como pequeño (menor a 15 mm), mediano (15 a 30 mm) y grande (mayor a 30 mm).

Figure 4. Percentage of experimental mares in which the largest follicle detected each month was classified as small (less than 15 mm), medium-sized (15 to 30 mm) or large (more than 30 mm).

En la Figura 5 se muestra el diámetro promedio del folículo más grande desarrollado en cada yegua durante cada semana. En el grupo testigo los folículos se mantuvieron, en promedio, alrededor de 15 mm de diámetro, aumentando a alrededor de 25 mm en marzo y abril, para llegar a 30 mm en mayo. En contraste, en el grupo experimental el diámetro promedio del folículo mayor aumentó en forma sostenida durante enero, llegando a casi 40 mm, para reducir posteriormente y mostrar un aparente patrón cíclico cada tres o cuatro semanas. Durante casi todo enero y febrero los diámetros promedio fueron significativamente mayores en el grupo experimental que en el grupo testigo ($P < 0.05$).

Como se muestra en el Cuadro 1, las yeguas del grupo experimental ovularon significativamente más pronto que las del grupo testigo ($P < 0.05$). No hubo diferencias entre grupos con respecto a la duración del intervalo entre el desarrollo del primer folículo grande y la ovulación. La longitud del periodo anovulatorio de cada yegua fue menor a 100 días en 25% de las yeguas del grupo testigo y en 79% de las yeguas expuestas al fotoperiodo artificial, siendo esta diferencia significativa ($P < 0.05$). Una yegua del grupo experimental nunca dejó de mostrar actividad ovulatoria cíclica.

Durante la etapa anovulatoria en la mayoría de las yeguas de los dos grupos se presentaron periodos en los que respondieron al recelado con uno o más signos de estro (espejeo, micción, vocalizaciones, interés frente al macho y lordosis positiva) a pesar de no tener folículos grandes. Estos estros anovulatorios se presentaban a intervalos irregulares con duración promedio de 12 días (Figuras 1 y 2).

En ambos grupos, durante la etapa de transición también se presentaron estros con un folículo de talla preovulatoria que, sin embargo, no ovulaban. En la

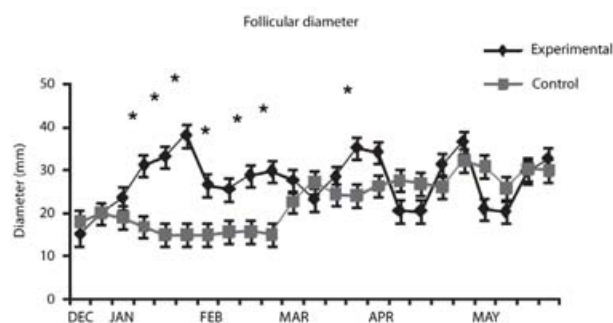


Figura 5. Diámetro semanal promedio del mayor folículo en las yeguas testigo y las yeguas expuestas a fotoperiodo artificial. Los asteriscos indican las ocasiones que hubo diferencia significativa entre los grupos ($P < 0.05$).

Figure 5. Average weekly diameter of the largest follicle in control mares and mares exposed to artificial photoperiod. Asterisks indicate the weeks in which the difference between groups was significant ($P < 0.05$).

Cuadro 1
CARACTERÍSTICAS DEL PERIODO ANOVULATORIO DE YEGUAS MANTENIDAS
EN FOTOPERIODO NATURAL Y YEGUAS EXPUESTAS A FOTOPERIODO DE
16 H LUZ Y OCHO H OSCURIDAD.
CHARACTERISTICS OF THE ANOVULATORY PERIOD OF MARES MAINTAINED
UNDER NATURAL PHOTOPERIOD OR EXPOSED TO AN ARTIFICIAL PHOTOPERIOD
(16 H LIGHT AND EIGHT H DARKNESS).

<i>Variable</i>	<i>Control (n = 8)</i>	<i>Experimental (n = 12)</i>
Interval from the start of the study* to the first ovulation (days, mean $\pm$ standard error)	137.25 $\pm$ 15.01 ^a	88.42 $\pm$ 5.8 ^b
Shortest and longest anovulatory period (range). Expressed in days.	70-196 (126)	0-158 (158)
Duration of the transition period (days, mean $\pm$ standard error)	37.63 $\pm$ 6.6 ^a	30.92 $\pm$ 2.2 ^a

*The study started on December 1st.

^{a,b} For a given variable, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

the year,¹⁶⁻¹⁸ resulting in a true anovulatory period of varied duration that occurred between November and May.

In this study, exposure to a photoperiod of 16 h of light and eight hours of dark (16L:8D) advanced the onset of the ovulatory season by an average of 49 days. This effect is similar to what has been reported at higher latitudes (42 to 48 days).^{9,10,17} The length of the anovulatory period in the mares exposed to artificial photoperiod in the present study (88.4 $\pm$ 5.8 days) indicates that mares had a favorable response to artificial photoperiod, since it was significantly shorter than the anovulatory period of control mares (137 $\pm$ 15 days) and was also shorter than that reported by other authors using the same program of artificial photoperiod (101 $\pm$ 2 days) (100 $\pm$ 1 days) (105 $\pm$ 3 days).^{9,17,19} Thus, most of our mares exposed to artificial photoperiod became cyclic between February and March.

Several authors have indicated that the precise number of light hours in an artificial photoperiod program is not essential for the advancement of ovarian activity.^{3,9,19} It is also not necessary to expose the mares to gradual increases in artificial photoperiod that mimic those that naturally occur after the winter solstice. What is needed to obtain a response is that the mare perceives an increase in day length with respect to the natural photoperiod to which it has been exposed before the onset of exposure to the artificial photoperiod, and that this exposure coincides with the photo-sensitive phase of the mare's circadian rhythm.^{9,20}

Before the onset of this study the mares had been exposed to a natural photoperiod with approximately 11 h of light and 13 h of darkness. Thus, exposure to the artificial photoperiod resulted in a sudden increase

mayoría de los casos la primera ovulación se presentó a partir de un folículo grande acompañado de signos de estro durante dos o más semanas antes de presentarse la ovulación.

En la Figura 6 se ilustra la distribución del reinicio de la actividad ovulatoria en ambos grupos. Como se observa en el grupo experimental, una yegua nunca dejó de ciclar. El resto de las yeguas que sí tuvieron periodo anovulatorio y las primeras ovulaciones comenzaron a ocurrir hasta la primera semana de febrero, cuando aquéllas llevaban nueve semanas expuestas al fotoperiodo artificial. Cinco semanas después, todas las yeguas del grupo habían tenido su primera ovulación. En contraparte, en el grupo testigo las primeras yeguas que ovularon lo hicieron hasta abril, cuando habían transcurrido 19 semanas desde el inicio del estudio, requiriéndose siete semanas más para que todas las yeguas del grupo testigo llegaran a su primera ovulación..

Discusión

El presente estudio fue realizado en un sitio (19°N) en el que la variación máxima en la longitud del fotoperiodo a través del año es de sólo dos horas,¹² varias investigaciones han sugerido que la estacionalidad reproductiva de la yegua puede reducirse en latitudes en que el cambio en la duración del día a lo largo del año no es muy marcado.¹⁵ Sin embargo, los resultados del presente estudio demuestran que las yeguas criollas localizadas a los 19°N mantienen un patrón de reproducción estacional regido por el fotoperiodo, el cual puede ser modificado por medio de su exposición a fotoperiodo artificial.

La mayoría de las yeguas del grupo testigo presentaron un patrón estacional muy similar al que se ha descrito en latitudes en las que la variación en la

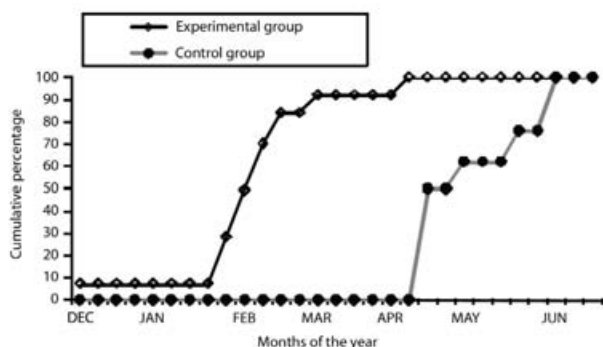


Figura 6. Porcentaje acumulado de yeguas expuestas o no a fotoperiodo artificial que habían reiniciado la actividad ovulatoria en diferentes periodos del año

Figure 6. Cumulative percentage of mares in the control and the experimental group that had resumed ovulatory activity in different months.

of about five h of light per day, and this was enough to advance the onset of the ovulatory season.

The period of transition between the onset of follicular development and the first ovulation was slightly different between the experimental and the control groups (31 ± 2 and 38 ± 7 days, respectively), but the difference was not significant ($P < 0.05$). The length of this period is similar to or shorter than that found by other authors which have reported a very variable length period ranging from 30 to 90 days.¹⁵

Figures 1 and 2 show that in both groups there was ample individual variation both in the duration of the anovulatory period and in the date of the onset of ovulatory activity. Most of the mares exposed to artificial photoperiod responded in a similar way (11 of the 14 mares had their first ovulation within the first 4 weeks of exposure); the exceptions ranged from an animal that had no anovulatory period (E14), to another mare that experienced a two-month delay with respect to other mares (E13). This kind of difference has been found by other authors, and can be due to genetic differences, age and body condition of the animals.^{2, 21, 22}

Mare E14 of the experimental group maintained regular ovulatory activity throughout the study (Figure 2). It has been reported that manipulation of the photoperiod results in a proportion of mares exhibiting continuous reproductive activity. This tends to occur in older animals, which apparently can respond to artificial photoperiod with such speed that they become stimulated even before they stop ovulating at the end of December or the beginning of January, in such a way that their ovulatory season just extends.^{3, 9, 19, 20} However, the case of mare E14 is not necessarily related to the treatment, because in the farm where this study was carried out there have been mares that maintain continuous activity without the need of exposure to artificial photoperiod.⁶

longitud del día a lo largo del año es más grande,¹⁶⁻¹⁸ presentando un periodo anovulatorio de duración variable que ocurrió entre noviembre y mayo.

En el presente trabajo la exposición a un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad (16L:8D) adelantó en promedio 49 días el inicio de la época ovulatoria, lo que es similar a lo encontrado en experimentos realizados en latitudes más elevadas (42 a 84 días).^{9, 10, 17} La duración del periodo anovulatorio de las yeguas expuestas al fotoperiodo artificial en el presente trabajo (88.4 ± 5.8) indica que las yeguas respondieron en forma favorable, ya que no sólo fue significativamente menor que la duración del periodo anovulatorio de las yeguas testigo (137 ± 15 días), sino que fue más corto que el informado por otros autores utilizando el mismo programa de luz artificial (101 ± 2 días) (100 ± 1 días) (105 ± 3 días).^{9, 17, 19} La buena respuesta permitió que la mayoría de las yeguas expuestas al fotoperiodo artificial comenzaran a ciclar durante febrero y marzo.

Algunos autores han indicado que el número exacto de horas luz en un programa de fotoperiodo artificial no es esencial para que las yeguas adelanten su actividad ovárica.^{3, 9, 19} Tampoco es necesario que las yeguas sean expuestas a incrementos graduales de fotoperiodo artificial como los que ocurren en forma natural a partir del solsticio de invierno. Lo importante para obtener una respuesta es que la yegua perciba un incremento en la longitud del día con respecto al fotoperiodo natural al que estuvo expuesta antes de iniciar la exposición a fotoperiodo artificial y que esta exposición sea recibida durante la fase fotosensible del ritmo circadiano de las yeguas.^{9, 20}

Antes de iniciar el presente experimento las yeguas estaban expuestas a un fotoperiodo natural de aproximadamente 11 horas de luz y 13 de oscuridad, por lo que la exposición al fotoperiodo artificial resultó en repentino incremento de aproximadamente cinco horas en la duración del periodo luminoso, el cual fue suficiente para acelerar el inicio de la época ovulatoria.

La duración del periodo de transición entre el inicio de la actividad folicular y la primera ovulación, fue ligeramente distinto entre los grupos experimental y el testigo (31 ± 2 y 38 ± 7 días, respectivamente), pero la diferencia no fue significativa ($P < 0.05$). La duración de este periodo es similar o menor al observado por otros autores, quienes han encontrado un periodo de longitud muy variable que puede durar desde 30 hasta 90 días.¹⁵

Las figuras 1 y 2 muestran que ambos grupos presentaron considerable variación individual, tanto en la duración del periodo anovulatorio como en la fecha de inicio del periodo ovulatorio. En el grupo expuesto a fotoperiodo artificial, a pesar de que la respuesta fue bastante similar en la mayoría de las

Mare E13 did not respond to exposure to artificial photoperiod and her first ovulation occurred on April, at about the same time when the control mares started to ovulate. It is not possible to know the cause of this lack of response, since this was a mature animal with no previous exposure to artificial photoperiod, making improbable a photorefractory period as those described by Nagy *et al.*³

In several studies conducted at different locations, it has been found that the first ovulation of the year is preceded by a gradual increase in follicular activity, both in terms of the frequency of follicular growth and in terms of the maximal diameter attained by the follicles.^{17, 21,23} During this period the ovaries show waves of follicular development characterized by a growth phase, a static period and a phase of regression of the dominant follicle, with an average development of 3.7 dominant anovulatory follicles that reach 30 or more mm in diameter, at intervals of 9.9 days.^{24,25} This results in a period of transition of 30 to 40 days, similar to the one found in the present study both in the control and in the experimental mares.

The results of this study demonstrate that the artificial photoperiod effect advances the onset of the development of large follicles, which started to appear during late December and early January in the experimental group, while they appeared in March in the control group (Figures 1, 2, 3 and 4). In contrast, the interval from the appearance of the first large follicle until the first ovulation (transition period) was similar for both groups (Table 1), suggesting that all mares must go through a period of transition characterized by the presence of persistent large follicles, and that exposure to artificial photoperiod does not reduce the length of the transitional period.

The stimulatory effect of exposure to artificial photoperiod on the development of large follicles is quite rapid, since only three to five weeks of exposure were required for the experimental mares to show large follicles in their ovaries, while the control mares required around eight weeks to do the same.

However, a practical reproductive effect is only attained with the first ovulation, which in this study occurred during the third month of exposure to the artificial photoperiod, after the mares went through the period of transition. This result suggests that an additional approach to artificial control of reproduction would be to combine exposure to artificial photoperiod with a treatment aimed to reduce the duration of the transitional period, such as the administration of ovulation-inducing hormones (GnRH or hCG).

On the other hand, as reported by other authors,^{6,18} estrous behavior occurred in all mares during the anovulatory period. This effect can be due to low

yeguas (11 de las 14 tuvieron su primera ovulación en un periodo de cuatro semanas), se presentaron excepciones que variaron desde una yegua (E14) que no presentó periodo anovulatorio, hasta otra (E13) que presentó un retraso de dos meses con respecto a la mayoría de las yeguas. Estas diferencias han sido registradas por otros autores y pueden deberse, entre otras causas, a diferencias de edad, diferencias genéticas y diferencias genéticas, de edad y de estado corporal de los animales.^{2, 21,22}

La yegua E14 del grupo experimental mantuvo actividad ovulatoria regular durante todo el periodo de estudio (Figura 2). Se ha informado que la manipulación del fotoperiodo está acompañada por una proporción de yeguas que exhiben actividad reproductiva continua, predominantemente si son animales viejos, los cuales, al parecer, pueden responder tan rápidamente al fotoperiodo artificial que son estimulados antes de que dejen de ciclar a finales de diciembre o principios de enero, por lo que la estación ovulatoria simplemente se prolonga.^{3,9,19,20} Sin embargo, el caso de la yegua E14 podría no deberse al tratamiento, ya que en el rancho en el que se llevó a cabo el estudio se ha encontrado que algunas yeguas mantienen actividad ovulatoria continua sin necesidad de tratamiento alguno.⁶

La yegua E13 no respondió a la exposición al fotoperiodo artificial, ya que su primera ovulación se presentó hacia mediados de abril, que corresponde al periodo en que las yeguas testigo comenzaron a ovular. No es posible señalar la causa de esta falta de respuesta, ya que se trataba de una yegua madura sin ninguna exposición anterior a fotoperiodo artificial, lo cual hace difícil pensar que se trate de un periodo fotorrefractario, como el que mencionan Nagy *et al.*³

En varios estudios realizados en diversos sitios se ha encontrado un incremento gradual de la actividad folicular antes de la primera ovulación del año de la yegua, que se manifiesta en incremento del diámetro folicular y en aumento en la frecuencia de presentación de folículos grandes.^{17, 21,23} Durante esta etapa los ovarios presentan oleadas de desarrollo folicular caracterizadas por una fase de crecimiento, mantenimiento y regresión de folículos dominantes anovulatorios, presentándose un promedio de 3.7 folículos dominantes anovulatorios mayores a 30 mm de diámetro, a intervalos promedio de 9.9 días,^{24,25} lo que resulta en un periodo de transición de entre 30 y 40 días, como el encontrado en el presente estudio, tanto en las yeguas del grupo testigo como en las expuestas a fotoperiodo artificial.

Los resultados del presente trabajo sugieren que el efecto del fotoperiodo artificial consiste básicamente en adelantar el inicio de la etapa de desarrollo de folículos grandes, los cuales comenzaron a aparecer

progesterone concentrations present at this time, as well as to the stimulatory presence of the stallion.²⁶ Exposure to artificial photoperiod did not modify the occurrence or frequency of anovulatory estrus.

The results of this study demonstrate that a regime of artificial photoperiod of 16 hours of light and eight hours of darkness, initiated on December 1st, stimulates follicular development and advances the moment of the first ovulation in anestrus mares located at 19°9'N without affecting the length of the transitional period. As a result, exposure to artificial photoperiod shortens the duration of the anovulatory period and advances the first ovulation of the year in Criollo mares in latitudes that are relatively close to the equator.

Acknowledgements

This work was supported by project PAPIME PE208306-Universidad Nacional Autónoma de México.

Referencias

1. GUERIN M, WANG X. Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare". *Theriogenology* 1994;42:1053-1060.
2. FITZGERALD BP, MCMANUS CJ. Photoperiodic *versus* metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol Reprod* 2000;63:335-340.
3. NAGY P, GUILLAUME D, DAELS P. Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 245-262.
4. GINTHER OJ. "Reproductive Biology of the Mare". Wisconsin, USA: Ed. Equiservices Publishing, Cross Plains, 1992.
5. SHARP DC. Horse. In: KNOBILL E, NEILL JD, *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. San Diego Ca.,USA: Ed. Academic Press, 1998: 680-693.
6. BOETA M, PORRAS A, ZARCO L, AGUIRRE-HERNANDEZ R. Ovarian activity of the mare during winter and spring at a latitude of 19°21' North. *J Equine Vet Sci* 2006;26:55-58.
7. HART PJ, SQUIRES EL, IMEL KJ, NETT TM. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol Reprod* 1984;30:1055-1062.
8. DAELS PF, BESOGNET B. Manipulation of the estrous cycle in the mare: clinical aspects. *Reprod Dom Anim* 1998;33:101-102.
9. MALINOWKI K, JOHNSON AL, SCANES CG. Effects of interrupted photoperiods on the induction of ovulation in anestrus mares. *J Anim Sci* 1985;61:951-955.
10. OXENDER WD, NODEN PA, HAFS HD. Estrus, ovulation and serum progesterone, estradiol, and LH concentrations in mares after an increased photoperiods during winter. *Anim J Vet Res* 1977;38:203-207.
11. VÁZQUEZ-DUEÑAS S, ESCOBAR-MEDINA FJ, COLINA-FLORES F, HAYEN-VALLES S. Comporta-

a finales de diciembre y principios de enero en el grupo experimental, mientras que en el grupo testigo aparecieron hasta marzo (figuras 1, 2, 3 y 4). En cambio, el intervalo que transcurrió desde la aparición del primer folículo grande hasta la primera ovulación (periodo de transición) fue similar en ambos grupos (Cuadro 1), lo que sugiere que todas las yeguas deben pasar por un periodo de transición caracterizado por la presencia de folículos grandes persistentes, y que la exposición al fotoperiodo artificial no elimina esta necesidad.

El efecto estimulador del fotoperiodo artificial sobre el desarrollo folicular fue muy bueno, ya que en la mayoría de las yeguas los folículos grandes comenzaron a aparecer en los ovarios entre la tercera y la quinta semanas de exposición al fotoperiodo artificial, mientras que en el grupo testigo se presentaron alrededor de ocho semanas después.

Sin embargo, en términos reproductivos prácticos el efecto se observa hasta que se produce la primera ovulación, lo que en el presente experimento ocurrió durante el tercer mes de exposición al fotoperiodo debido a que las yeguas estimuladas aún debían pasar por el periodo de transición. Este resultado sugiere que una posibilidad adicional de control artificial de la reproducción consistiría en combinar la exposición a fotoperiodo artificial con algún tratamiento que reduzca la duración del periodo de transición, como sería la aplicación de hormonas inductoras de la ovulación (GnRH o hCG).

Por otra parte, en todas las yeguas se presentó conducta estral durante el periodo anovulatorio, como lo informan estudios anteriores,^{6,18} lo cual se debe a los bajos niveles de progesterona presentes durante el periodo anovulatorio, así como a la presencia estimulante del garrón.²⁶ La exposición al fotoperiodo artificial no modificó la ocurrencia o frecuencia de estros anovulatorios.

Los resultados del presente estudio sugieren que el modelo de fotoperiodo artificial de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad, iniciado el 1 de diciembre, estimula óptimamente el desarrollo folicular y adelanta el tiempo de ovulación en yeguas anéstricas localizadas a 19°9'N, sin afectar la duración del periodo de transición. Como resultado, la exposición a fotoperiodo artificial acorta la duración del periodo anovulatorio y adelanta la primera ovulación del año en yeguas criollas localizadas en latitudes relativamente cercanas al ecuador.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con el proyecto PAPIME PE208306, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- miento reproductivo de yeguas Pura Sangre Inglés en un criadero de partos al principio del año. *Rev Biomed* 2004;15:27-31.
12. SALTIEL A, CALDERON A, GARCIA N, HURLEY DP. Ovarian activity in the mare between latitude 15° and 22° N. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:261-267.
 13. GONZÁLEZ FM, VALENCIA MJ. Estudio del comportamiento reproductivo de la yegua en México. *Vet Méx* 1977;8:19-23.
 14. KOSKINEN E, HUNTINEN M, KATILA T. Serum progesterone levels in mare in winter and during transitional periods. *Acta Vet Scand* 1996;37:409-414.
 15. DONADEU FX, WATSON ED. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci* 2007;100:225-242.
 16. ARTHUR GH. An analysis of the reproductive function of mares based on *post mortem* examination. *Vet Rec* 1958;70:682-686.
 17. FREEDMAN LJ, GARCIA MC, GINTHER OJ. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. *Biol Reprod* 1979;20:567-574.
 18. GINTHER OJ. Occurrence of anestrus, estrus, diestrus, and ovulation over 12-month period in mares. *Am J Vet Res* 1974;35:1173-11179.
 19. SCRABA ST, GINTHER OJ. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 1985;24:667-679.
 20. PALMER E, DRIANCOURT MA, ORTAVANT R. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:275-282.
 21. CARNEVALE EM, HERMENET MJ, GINTHER OJ. Age and pasture effects on vernal transition in mare. *Theriogenology* 1997;47:1009-1018.
 22. WESSON JA, GINTHER OJ. Puberty in the female pony: Reproductive behavior, ovulation, and plasma gonadotropin concentrations. *Biol Reprod* 1981;24:977-986.
 23. GINTHER OJ. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J Reprod Fert* 1990;90:311-320.
 24. DONADEU FX, GINTHER OJ. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod* 2002; 66: 1111-1118.
 25. WATSON ED, Al-Zi`abi MO. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. *Reproduction* 2002;124: 227-234.
 26. IRVINE CHG, ALEXANDER SL. Managing the mare for optimal fertility. *J Equine Sci* 1998;9:83-87.