



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD XOCHIMILCO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

*“Distrés, variabilidad de la frecuencia cardiaca,  
comportamiento y vocalizaciones de la yegua  
ante la separación de su potrillo.”*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

P R E S E N T A:

**M.V.Z. CHRISTIAN ANEL MARTINEZ CASTILLO**

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA:

**PHD. MARÍA DE LOURDES ALONSO SPILSBURY (UAM-X)**

CODIRECTOR:

**PHD. PETER SZENCZI (U. DE TLAX.)**

ASESORA:

**PHD. ROBYN ELIZABETH HUDSON (IIM, UNAM)**

CIUDAD DE MÉXICO

MARZO/2021



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	8
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	9
<b>2.1 EL ESTRÉS</b>	9
2.1.1 AGENTES INDUCTORES DE ESTRÉS	9
2.1.2 EL DISTRÉS	10
2.1.3 NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS	11
<b>2.2 LA YEGUA</b>	13
2.2.1 GENERALIDADES DE LA GESTACIÓN	13
2.2.2 RECONOCIMIENTO DE LA MADRE-CRÍA	13
2.2.3. LA IMPRONTA	14
2.2.4 EL DESTETE	14
<b>2.3 ESTRÉS POR SEPARACIÓN YEGUA-POTRO</b>	17
2.3.1 EVALUACIÓN DEL DISTRÉS POR SEPARACIÓN	18
2.3.1.1 VARIABILIDAD DEL RITMO CARDIACO	19
2.3.1.2 CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO ANTE EL ESTRÉS	22
2.3.2 EVALUACIÓN DEL SUFRIMIENTO O DOLOR MENTAL	24
2.3.3 VOCALIZACIONES	28
<b>3. OBJETIVOS</b>	31
3.1 OBJETIVO GENERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31

<b>4. HIPÓTESIS</b>	31
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	32
5.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	32
5.2 MÉTODOS GENERALES	34
5.3 MEDICIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	35
5.4 VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA	35
5.5 MEDICIONES DEL COMPORTAMIENTO	36
5.6 EVALUACIÓN DEL SUFRIMIENTO O DOLOR MENTAL	37
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	38
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	39
6.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	39
6.2 VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA	40
6.2.1 EL INTERVALO RR	40
6.2.2 LA DESVIACIÓN DE LOS INTERVALOS RR (SDRR)	42
6.2.3 LA RELACIÓN LF / HF	43
6.2.4 REPETIBILIDAD DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS	45
6.3 EL COMPORTAMIENTO	46
6.3.1 DURACIÓN DEL ESTADO DE ALERTA	46
6.3.2 DURACIÓN DE LA COLA ELEVADA	47
6.3.3 OTRAS VARIABLES CONDUCTUALES	48
6.4 EVALUACIÓN DEL SUFRIMIENTO O DOLOR MENTAL	50
6.5 VOCALIZACIONES	53
<b>7. CONCLUSIONES</b>	55
<b>REFERENCIAS</b>	56

## RESUMEN

La separación madre cría ha sido descrita como un proceso psicológico estresante que compromete el bienestar físico y mental de los equinos. El objetivo del presente estudio fue evaluar las respuestas al estrés por separación madre cría en yeguas, comparando diferentes métodos: la monitorización fisiológica en términos de variabilidad del ritmo cardíaco (VRC), la observación de comportamientos relacionados con el estrés, y la "escala gestual del dolor en el caballo" del protocolo AWIN. El estudio se llevó a cabo con 20 yeguas multíparas de diferentes edades de la raza Azteca; cada yegua fue evaluada en cuatro tiempos, cuando el potro tenía tres días de edad, seis semanas, doce semanas y al destete. La VFC fue registrada empleando el equipo de telemetría Polar. Se registraron cambios en las variables de la VFC durante la separación por 2 min. —para compararlos con las mediciones basales (primeros 15 min.)— y en la velocidad de recuperación, después de la reunión de la yegua con su potro (últimos 15 min.). En conjunto, los análisis de la VFC con un decremento significativo en el intervalo R-R, que refleja una activación con dominio del sistema simpático y una falta de cambios en la desviación estándar de los intervalos de latido a latido (SDRR), el componente bajo (LF; tono simpático) y el de alta frecuencia (HF; el tono parasimpático) y su relación (LF/HF; un índice que representa el equilibrio simpático-vagal), junto con las conductas potencialmente indeseadas en las yeguas (posiciones de las orejas hacia atrás, estados de alerta, vocalizaciones, cola levantada y con una mayor proporción de esclerótica expuesta), muestran que tuvieron niveles de ansiedad, indicando un estrés moderado transitorio ante la separación transitoria de los potrillos, lo que sugiere que las yeguas están siendo resilientes al proceso de destete y a una completa separación de sus crías.

**Palabras clave:** yegua, variabilidad de la frecuencia cardiaca, estrés por separación, comportamiento, ansiedad.

## **Abstract**

The present study investigated psychophysiological and behavioral responses in a sample of 20 healthy adult Azteca mares during brief separation from their foals at four different times before weaning: when their foals were three days, six weeks, twelve weeks and six months old. All tests included a baseline (15 min), separation (2 min) and reunion (15 min) phase. Time and frequency domains of heart rate variability parameters were recorded with a portable non-invasive Polar® device. As expected, the separation from the foal elicited an anxious response in the mother with significant decrease in the average beat-to-beat interval (RR), which reflects an activation of the HPA axis and a shift to more sympathetic dominance of the autonomic nervous system. A lack of change of the standard deviation of the beat-to-beat interval (SDRR), the root mean square of successive RR differences (RMSSD), and the ratio of low to high frequencies supports the finding that this common management procedure was only a modest temporary stressor. In terms of behavior response, separation caused undesirable stress-related behaviors indicating a level of anxiety, namely change in vocalization, ears pinned back, alertness and tail up were significantly different from baseline. All these reactions to separation decreased with age of the foal except stiffly backward ears. All together the HRV analysis and behavioral suggest that mares are being moderately resilient to the weaning process and complete separation from their offspring.

**Keywords:** horse, mare, heart rate variability, separation distress, behavior, anxiety.

## INTRODUCCIÓN

Las crías de los mamíferos domésticos son normalmente separadas de manera brusca y de forma permanente de sus madres a una edad relativamente temprana, a menudo antes del momento del destete natural. Esta estrategia se lleva a cabo apresuradamente para lograr un pronto regreso al ciclo reproductivo de las madres y para permitir a los productores incrementar el rendimiento productivo de las crías. Sin embargo, al hacerlo, el vínculo social entre la madre y su cría, que se desarrolló en cuestión de horas después del parto, se interrumpe ocasionándole estrés a ambos, madre y cría.

El distrés es signo de que los intentos del animal para enfrentarse a un estímulo aversivo se ven sobrepasados. Durante estrés severo, prolongado o acumulativo, el animal dirigirá recursos de funciones biológicas menos esenciales con cambios que pueden conllevar a patologías. Bajo estas circunstancias, el animal experimentará distrés y su bienestar estará comprometido (Clark, 2008).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el distrés en la yegua ocasionado por su separación del potrillo empleando indicadores no invasivos como la variabilidad de la frecuencia cardiaca, la evaluación del sufrimiento o dolor mental ("*grief pain*") mediante expresiones faciales y el comportamiento incluyendo vocalizaciones.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La meta principal de los criadores de caballos es que cada una de sus yeguas tenga una cría al año. Las yeguas entran en estro de 6 a 9 días después del parto, de forma que los criadores le retiran al potrillo para poder realizar la detección de estro de forma más oportuna. Se revisa su receptividad sexual 6 días post-parto, ocasión en la que el potrillo es separado de su madre por primera vez; este manejo se realiza hasta por 5 días continuos. El aislamiento breve y continuo al que se ve sometido el potrillo durante dicho manejo puede ocasionarle distrés antes del destete y puede desarrollar problemas conductuales o incluso estereotipias (McGee y Smith, 2004). Tradicionalmente se estudia el impacto que dicho estrés le ocasiona a la cría destetada, siendo los principales indicadores un aumento en las vocalizaciones y la actividad locomotora. Sin embargo, la información en cuanto a la respuesta fisiológica y conductual de las madres es escasa, especialmente en la yegua.

Cuando se les retiran a sus hijos, las madres lactantes pueden experimentar incomodidad temporal por una ubre distendida además de estrés por la retirada repentina de experiencias placenteras asociadas con el contacto físico con sus crías. Aunado a lo anterior, es conocido que las yeguas que son altas reproductoras genéticas, tienen un valor monetario por encima de otras yeguas y el estrés es inhibidor de la GnRH, por lo que el celo de los animales ve interrumpido y con ello toda la cadena reproductiva se verá afectada con pérdidas económicas para el criador y compromiso del bienestar para la yegua. Así mismo, la temprana separación de sus crías puede favorecer la aparición de enfermedades o conductas estereotipadas que compliquen su manejo reproductivo como el rechazo a ser montada (por agresión a los operarios o al garañón).



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 EL ESTRÉS**

El estrés es definido como la respuesta inespecífica del organismo ante cualquier demanda externa cuando los animales se encuentran sujetos a condiciones ambientales adversas que interfieren con su bienestar (Stott, 1981). Moberg (2000) lo define como la respuesta biológica que se presenta cuando un individuo percibe alguna amenaza a su homeostasis. El estrés puede ser positivo o negativo (Broom y Johnson, 1993), cuando es negativo como el que ocurre en la separación de la yegua de su potrillo, se le denomina distrés (Malinowski *et al.*, 1990).

#### **2.1.1 Agentes inductores de estrés**

Los agentes inductores de estrés (AIE) son detonadores de respuestas orgánicas capaces de desequilibrar los mecanismos reguladores de la homeostasis (Selye, 1973). Estos agentes pueden ser físicos, químicos, infecciosos o psicológicos.

El proceso de destete ha sido identificado como un agente psicológico estresante, asociado con cambios físicos y nutricionales que son de interés desde el punto de vista del bienestar animal (Waran *et al.*, 2008). El destete resulta en una privación no solo de la leche materna, sino también de sus cuidados y de aislamiento o mezcla con otros individuos. Tradicionalmente se evalúa la respuesta de estrés en las crías y se ha prestado relativamente poca atención a la respuesta de las madres ante la separación temprana de sus crías. Debido a la retirada repentina de experiencias placenteras asociadas con el contacto físico con las crías (por ejemplo, el acicalamiento y cuidados), dependiendo de la capacidad para responder ante la situación, es comprensible que las madres en algunas especies pueden experimentar confusión, aprensión o ansiedad (Hofmann *et al.*, 2005; Newberry y Swanson, 2008) asociadas con frustración de las expectativas y el fracaso de no localizar a sus crías (Newberry y Swanson, 2008).

Según Gaydou *et al.* (2009) los AIE son capaces de desequilibrar los mecanismos reguladores homeostáticos, de manera tal que el organismo pierde la capacidad de mantener sus oscilaciones fisiológicas dentro de límites normales y

se activa el síndrome general de adaptación, término acuñado por el húngaro Hans Selye (Selye, 1973), mismo que comprende tres fases:

- a) Reacción de alarma: dada por la respuesta inmediata del sistema nervioso simpático ante una estimulación aguda. Afecta a varios sistemas y tejidos corporales.
- b) Resistencia o adaptación: se presenta cuando hay una estimulación crónica y existe una participación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), cuyas implicaciones en ambos casos pueden llevar al organismo a un estado de resistencia y adaptación. La activación del eje HHA es por tanto, crucial para la adaptación del individuo a una situación estresante. En esta etapa se estimula a las defensas que permiten al cuerpo resistir los efectos estresantes.
- c) Agotamiento: fase en la que un estímulo crónico sobrepasa los niveles de resistencia y conduce al agotamiento de la energía de adaptación, y finalmente a la muerte. Esta etapa se presenta cuando el cuerpo experimenta estrés por varios factores o es expuesto de manera repetida a los mismos estresores agudos. En este caso se presenta una sobreexposición a las hormonas del estrés, que produce un costo biológico suficiente para alterar las funciones biológicas y producir distrés (Orozco, 2013).

### **2.1.2 El distrés**

El *Oxford English Dictionary* (1973) define el distrés como “*angustia o aflicción que afecta el cuerpo, espíritu o comunidad*” y el verbo distrés significa “*hacer miserable*”. El Código de Bienestar de Australia (2004), lo define como: “*el estado en el que un animal es incapaz de adaptarse completamente a los estresores y manifiesta respuestas fisiológicas y conductuales anormales. Puede ser agudo o crónico y puede resultar en condiciones patológicas*”.

De acuerdo con Mellor *et al.* (2000), un animal entra en un estado de distrés cuando es expuesto a experiencias nocivas que producen respuestas fisiológicas,

independientemente de si el estímulo es emocional (miedo); físico (ejercicio intenso) o de ambos tipos (dolor).

El distrés es un signo de que los intentos de afrontamiento del animal al estímulo nocivo han sido sobrepasados. Durante un estrés severo, prolongado y acumulativo, el animal desvía los recursos de funciones biológicas menos esenciales cuyos cambios conllevan a patologías.

Los estados de distrés son estados que siempre se consideran patológicos, a diferencia del estrés que, a pesar de producir cambios fisiológicos, éstos pueden ser positivos desde el punto de vista de actuar como una reacción de defensa del animal frente a un estímulo que él considera nocivo.

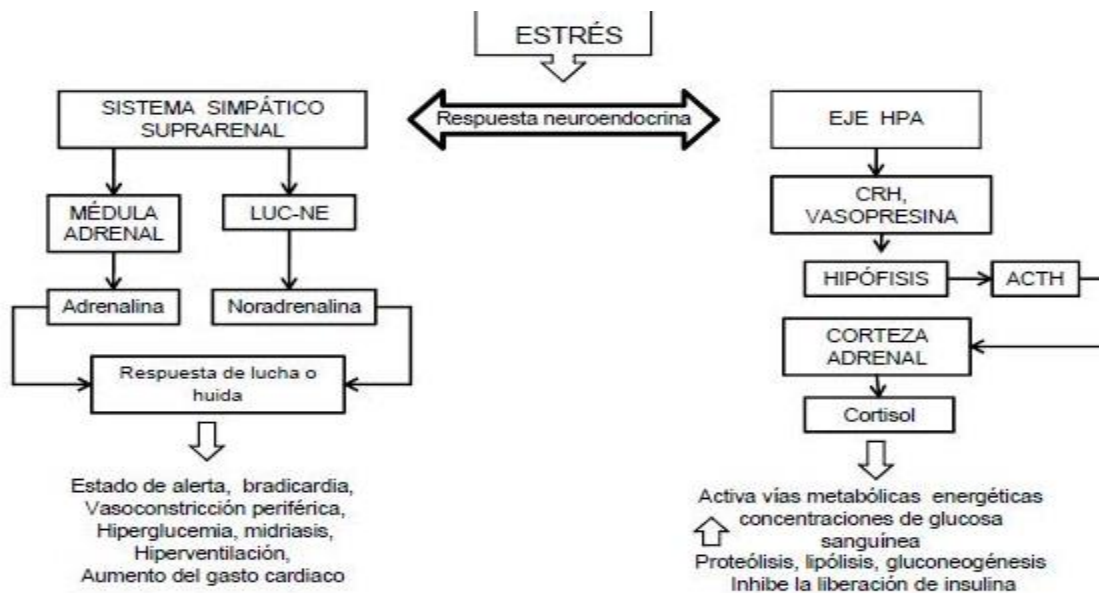
### **2.1.3 Neuroendocrinología del estrés**

En el eje HPA, los centros cognitivos del cerebro como la corteza cerebral, al percibir amenazas externas, inician los mecanismos de respuesta vía señales nerviosas que activan la liberación del factor liberador de corticotropina (CRH) y la vasopresina, especialmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo. La CRH es liberada por terminales de axones que se proyectan hacia la región de la eminencia media, y es transportada por el sistema sanguíneo portal hipofisiario hacia la hipófisis anterior estimulando la liberación de la hormona adenocorticotrópica (ACTH), la cual es liberada al torrente sanguíneo para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides, especialmente cortisol desde la corteza adrenal, cuya secreción es pulsátil, con una periodicidad de 90 minutos (Romero *et al.*, 2011).

El cortisol que es la hormona principal en el SGA o estrés, actúa normalmente sobre casi todas las células del organismo porque los receptores para él están distribuidos en todo el cuerpo (de Camargo, 2007). Durante el estrés a corto plazo, los glucocorticoides mejoran la movilización de la energía (Raynaert *et al.*, 1976), y las concentraciones de glucosa en la sangre, porque estimula la proteólisis, lipólisis, y la gluconeogénesis en el hígado aumentando la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa, aumentando la movilización de los aminoácidos desde el músculo. También disminuye el transporte

de glucosa y su utilización por las células, produciendo una elevación de la concentración de glucosa sanguínea hasta un 50% sobre el nivel normal (Romero *et al.*, 2011). Aunque también se liberan catecolaminas como adrenalina y noradrenalina, las cuales son liberadas rápidamente, (uno o dos segundos después de la percepción del estímulo (Romero *et al.*, 2011) por la médula adrenal; son las encargadas de poner al animal en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir, provocando un aumento en la frecuencia cardíaca, vasoconstricción periférica, hiperglicemia, dilatación pupilar y aumento del volumen sanguíneo (el cual tiene un efecto benéfico puesto que aumenta el aporte de oxígeno y sustratos para la producción de energía en tejidos vitales) (Ponce *et al.*, 1998), y noradrenalina de las fibras nerviosas del *locus coeruleus* localizado en el tallo cerebral (Lay y Wilson, 2001).

Para una mayor comprensión de la neuroendocrinología del estrés, se muestra el esquema de la respuesta general del estrés en la **Figura 1**.



**Figura 1. Respuesta general del estrés.** Tomada de Romero *et al.* (2011).

## **2.2 LA YEGUA**

### ***2.2.1 Generalidades de la gestación***

La actividad reproductiva en el caballo es estacional. La estación reproductiva natural de las yeguas se extiende desde la primavera hasta finales del verano, lo que en el hemisferio norte implica desde abril hasta septiembre, y en el hemisferio austral desde octubre hasta marzo. Los caballos son llamados reproductores “de días largos”, ya que su actividad cíclica normal se activa, principalmente, por el aumento en la duración del día —es decir, el fotoperiodo creciente— a principios de la primavera, mientras que a finales del verano y principios del otoño, el acortamiento de la duración del día (es decir, el fotoperiodo decreciente) desencadena la finalización de la estación reproductiva (Intervet, 2007).

La duración de la gestación equina normalmente es de 335 a 345 días. Pueden nacer potros normales antes de 335 días y después de 365 días, dependiendo del ambiente intrauterino. Las yeguas primíparas suelen tener gestaciones más cortas y las yeguas más viejas, más largas. Los signos clínicos que indican un parto inminente incluyen desarrollo de la ubre, cambio en la forma del abdomen caudal, alargamiento de la vulva, y en algunas ocasiones, cambios en el comportamiento social como el estar apartada del resto de su grupo social. Cuando comienza la primera etapa del nacimiento los signos incluyen muestras de inquietud similar a los signos de cólico. La yegua mira hacia su abdomen, se acuesta y rápidamente vuelve a ponerse de pie; también puede levantar la cola y pueden caer de sus tetas gotas o chorros de leche debido a los efectos de la oxitocina. La segunda etapa del nacimiento es rápida y no debe durar más de 20 a 30 minutos y concluye con la expulsión del feto (Wilson, 2013).

### ***2.2.2 Reconocimiento de la madre-cría***

El caballo reconoce a sus congéneres mediante la voz y posteriormente por medio de estímulos visuales y olfativos. El reconocimiento yegua-potro parece estar basado en estímulos visuales, aunque las señales olfativas también parecen jugar un papel (Wolski *et al.*, 1980). De igual forma, la oxitocina, los esteroides gonadales,

la prolactina, los opioides, la dopamina y otros neurotransmisores, están implicados en el desarrollo y mantenimiento del vínculo madre-cría (Newberry y Swanson, 2008).

### **2.2.3 La impronta**

La palabra “*imprinting*” significa imprimiendo o dejando huella. El proceso de impronta se puede definir como las acciones y situaciones que el potro va registrando en su cerebro por parte del ser humano y su medio ambiente. El potrillo siempre está cerca de la madre, pues de ella aprenderá todo: a qué le debe temer, dónde encontrar comida, cuáles son los lugares seguros y sobre todo, el lugar jerárquico que ocupa dentro de la manada a la cual pertenece (Morones, 2013). El periodo crítico durante el que la madre muestra conducta materna intensa hacia su potrillo es durante los primeros 30 min.; la información olfativa de la cría es recibida por la madre a través del *flehmen*, vía el órgano vomeronasal hacia el sistema nervioso central. La madre presenta una alta tasa de lamido hacia su potrillo, lo que estimula su respiración, actividad general y secado; todas ellas funciones importantes para la supervivencia del neonato (Haupt, 2002).

Los potrillos comienzan a mamar 30 min. después de nacidos (Haupt, 2002). La asistencia de los potrillos recién nacidos durante su primera succión evita un acercamiento al humano más tarde (Henry *et al.*, 2006). Más aun, la manipulación de los potros en los dos primeros días después del nacimiento afecta la relación potro-yegua y altera su respuesta a los seres humanos —aunque no lo hace ante la novedad— (Søndergaard y Jago, 2010). Actualmente hay un interés centrado en las ventajas de manejar de forma intensiva a los potros jóvenes como medio para producir caballos más dóciles acostumbrados al ser humano y receptivos al entrenamiento (Simpson, 2002).

### **2.2.4 El destete**

Fraser (1985) describe al destete como la separación física de la madre y su cría, que conlleva a un quiebre en la relación madre-hijo, además de la privación por parte del potrillo de alimentarse de leche materna. Existen diversos sistemas de

destete que han sido utilizados en la industria equina por años, el sistema elegido depende de las facilidades, experiencias y preferencias de los criadores y administradores de criaderos, además de otras consideraciones tales como el número de animales destetados (Apter y Householder, 1996). Las formas de realizar el destete pueden ser clasificadas como abruptas y graduales (Davies Morel, 2003) [Cuadro 1]; sin embargo, existen otros métodos menos convencionales como el destete neonatal, destete a los 2 meses, y destete a los 7 a 8 meses (Apter y Householder, 1996).

**Cuadro 1. Tipos de destete más comúnmente usados en los criaderos equinos.**

<b>Tipo de destete</b>	<b>Definición</b>	<b>Edad del potro</b>	<b>Autor</b>
<b>Destete abrupto</b>	El más usado actualmente. La yegua es sacada de la caballeriza de manera brusca, dejando al potro solo, perdiendo contacto tanto visual y auditivo del potro. Los primeros días post destete son muy estresantes para el potro; son comunes la aparición de enfermedades y el daño físico.	4-6 meses	Apter y Householder (1996). Davies Morel (2003).
<b>Destete gradual</b>	Es realizado de forma gradual, separando a la yegua de su potro, pero sin perder contacto visual y auditivo. La proximidad del potrillo a la yegua permite el contacto físico y la interacción, pero no permite la lactación.	5-6 meses	Davies Morel (2003).
<b>Destete neonatal</b>	Similar al destete abrupto, sin embargo, muchas veces es realizado porque no queda alternativa, es decir, porque la yegua murió o enfermó, y el potro ya es capaz de sobrevivir con alimentos sólidos en su dieta.	Desde los 2 meses	Apter y Householder (1996)

En vida libre, el destete de los caballos salvajes tiene lugar de forma natural alrededor de las 40 semanas (Duncan *et al.*, 1984) o a los 8 a 9 meses (Gill, 1988), aunque algunas yeguas continúan amamantando a sus potros hasta poco antes de la llegada de su próxima gestación aproximadamente a los 342 días, dependiendo de la raza del caballo (Ropiha *et al.*, 1969). Sin embargo, en caballos domésticos el destete tiende a tener lugar antes, normalmente entre los 4 y 6 meses de edad. El proceso de destete ha sido identificado como un agente psicológico estresante, asociado con cambios físicos y nutricionales que son de interés desde el punto de vista del bienestar animal (Waran *et al.*, 2008). Los cambios sociales y ambientales del destete inducen estrés en los caballos (Houpt *et al.*, 1984). La técnica de destete más popular entre los criadores de caballos es el destete abrupto donde la yegua y su potrillo son destetados repentinamente sin que tengan contacto visual, auditivo u olfativo (Apter y Household, 1996; McCall *et al.*, 1985).

Según Waran *et al.* (2008), la mayoría de las investigaciones concernientes al impacto del destete han sido enfocadas a los efectos potenciales del destete individual comparado con el destete grupal, y del destete abrupto comparado con el destete gradual en los potrillos, e independiente del método usado, las respuestas vocales y locomotoras comienzan a aumentar a partir de los 30 minutos post-destete. Asimismo, entre los efectos del destete se han encontrado una serie de conductas asociadas al estrés (Waran *et al.*, 2008) que incluyen aumento de las vocalizaciones y locomoción, estereotipias o conductas auto-destructivas en el potro (McCall *et al.*, 1985; McGee y Smith, 2004). Además, en potrillos, un destete abrupto puede elevar considerablemente los valores de cortisol en saliva (Erber *et al.*, 2012).



### 2.3 ESTRÉS POR SEPARACIÓN YEGUA-POTRO

El establecimiento del vínculo yegua-potro es importante para el crecimiento y el desarrollo de un potro sano. Este vínculo es iniciado al nacer, la yegua lame al potro para desarrollar un registro olfativo y para estimularlo a ponerse de pie y mamar. El vínculo continúa desarrollándose hasta que está plenamente establecido cuando el potro tiene aproximadamente dos semanas de edad (Carson y Wood-Gush, 1983; Houpt, 2002).

El vínculo yegua-potro es más fuerte en las primeras semanas después del parto y disminuye a medida que el potro se acerca a la edad de destete (French, 1990; Estep *et al.*, 1993). Desde el primer día de vida, la yegua y el potro pasan 96% de su tiempo juntos, a una distancia de 1 metro el uno del otro (Barber y Crowell-Davis, 1994). La distribución espacial de la yegua y el potro también está influenciada por la postura del potro. Cuando el potro está en decúbito lateral —que representa aproximadamente el 32% del tiempo durante la primera semana de vida— (Barber y Crowell-Davis, 1994), la yegua se mantiene más cerca y muy rara vez a más de 5 metros de distancia del potro; incluso cuando éste tiene 8 semanas de edad, la separación espacial entre ambos se ha reportado que es inferior a 5 metros (Barber y Crowell-Davis, 1994).

En contraste, los caballos ferales son animales no territoriales, en términos de la relación madre-cría se les describe como especie seguidora. Bajo condiciones naturales se cree que la yegua se vincula con su potrillo cerca del parto, mientras que el potrillo desarrolla un apego hacia la madre un poco más tarde, entre los 2 y 3 días después del nacimiento (Tyler, 1972). El vínculo yegua-cría permanece fuerte hasta que el potro deja el grupo natal a la edad de 1 ó 4 años (Tyler, 1972; Monard *et al.*, 1996; Khalil y Kaseda, 1997).

El destete de los potros en condiciones de domesticación involucra varios cambios: privación de los cuidados maternos, cambios ambientales y sociales, intervención humana más intensa, cambios nutricionales muy abruptos —hay una transición repentina de la fuente de nutrientes— y prácticas de manejo (Nicol, 1999).

Otras respuestas observadas cuando los animales se separan y buscan reunirse incluyen patrones alterados de alimentación y sueño, suspensión del juego, niveles elevados de corticosteroides y cambios en su frecuencia cardíaca y temperatura corporal (Cirulli *et al.*, 1996; Koolhaas *et al.*, 1997; Donaldson *et al.*, 2002; Erber *et al.*, 2012).

Moons *et al.* (2005), registraron niveles elevados de cortisol en saliva de potros al día siguiente de destetarlos a los 6 meses de edad —los potros fueron destetados en corrales individuales sin contacto entre ellos—.

Por otro lado, la similitud que existe entre las regiones cerebrales activadas durante la separación madre-cría en el cobayo y las activadas durante la experiencia de dolor en los seres humanos (Panksepp, 2003; Newberry y Swanson, 2008), dan crédito a la hipótesis de que la separación prematura de madres y crías cuando están fuertemente unidos, se asocia con sentimientos de angustia (Newberry y Swanson, 2008). Se ha demostrado que la reacción emocional de miedo influye sobre la conducta materna en yeguas (Arnold, 1985).

### **2.3.1 Evaluación del distrés**

Existen cuatro sistemas de defensa para montar respuestas biológicas ante los estresores; ellas son respuestas conductuales, el sistema nervioso autónomo, el sistema neuroendocrino y el sistema inmune. Estos cuatro sistemas responden solos o combinados para mostrar signos que nos permitan reconocer si un animal está en distrés (Moberg, 2000).

Actualmente se están buscando métodos no invasivos para medir el bienestar animal, uno de ellos lo constituye la variabilidad del ritmo cardíaco (VRC) y su uso en la determinación de estrés al transporte en caballos (Rietmann *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2010a) o durante la separación y aislamiento del grupo social (Erber *et al.*, 2013). La VRC mide la actividad simpático-vagal como respuesta del sistema nervioso autónomo (SNA) (von Borell *et al.*, 2007). Entre los métodos no invasivos,

cabe destacar también el comportamiento animal (AWIN, 2015), y más recientemente, la evaluación de estados mentales como lo sugiere Mellor (2016).

### **2.3.1.1. Variabilidad del ritmo cardíaco**

La medición de la variabilidad del ritmo cardíaco es una técnica no invasiva que se puede utilizar para investigar el funcionamiento del SNA, especialmente el equilibrio entre la actividad simpática y vagal. Durante la última década, la VRC se ha utilizado cada vez más en la investigación con animales para analizar los cambios en el equilibrio simpático-vagal relacionados con enfermedades, factores de estrés psicológico y ambiental o características individuales como el temperamento y estrategias de afrontamiento (von Borell *et al.*, 2007).

La medición de la VRC resulta ser un enfoque prometedor para evaluar el estrés y los estados emocionales en los animales. Tiene el potencial de contribuir a nuestra comprensión y evaluación de los procesos neurofisiológicos subyacentes de las respuestas al estrés y diferentes estados de bienestar en los animales de granja (von Borell *et al.*, 2007). Los intervalos (tiempos) entre los latidos de un corazón normal muestran sutiles diferencias de duración que se traducen en cambios del ritmo cardíaco. Los métodos informáticos han facilitado la medición y almacenamiento de dichos intervalos, impulsando el estudio de su variabilidad en el tiempo, lo que se conoce con el nombre de variabilidad del ritmo cardíaco (Migliaro *et al.*, 2004).

La actividad del SNA, se basa en un equilibrio entre el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP). En un estado de reposo predomina la estimulación vagal (SNP), mientras que en estados de ansiedad, estrés y ejercicio físico, predomina la estimulación del SNS (Rodas *et al.*, 2008). El SNP se encarga de realizar una rápida disminución de la frecuencia cardíaca (FC) por impulsos eléctricos vagales de alta frecuencia. Este proceso viene dado por la liberación de acetilcolina por parte del nervio vago; algunos de sus efectos son la contracción pupilar, la disminución de la FC y de la contractilidad cardíaca, el aumento de la motilidad y de la secreción del tracto gastrointestinal, el aumento de

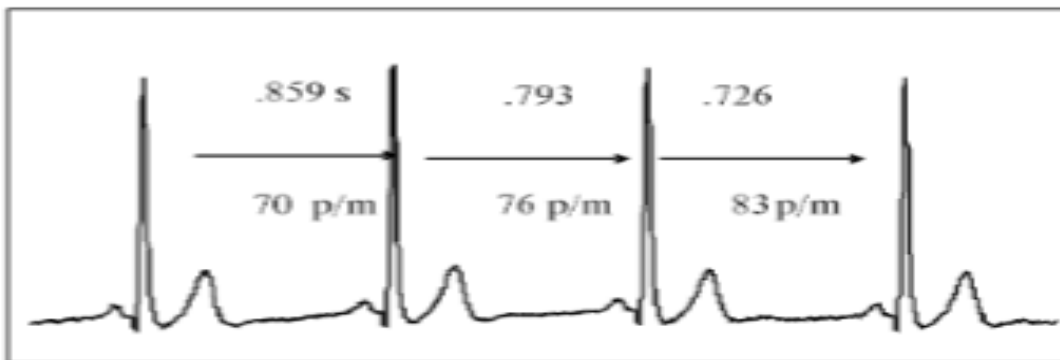
la secreción de insulina, el aumento de la secreción bronquial, y la relajación de los esfínteres vesical y anal entre otras funciones. Básicamente, el SNP gestiona los cambios reflejos de la FC debidos a señales procedentes de los barorreceptores arteriales y del sistema respiratorio (Rodas *et al.*, 2008).

El SNS aumenta la FC mediante impulsos lentos de baja frecuencia. La respuesta es más lenta que la del SNP (necesita 20 a 30 latidos para producirse). Este proceso está basado en la liberación de adrenalina y de noradrenalina. Entre sus efectos principales se encuentran la dilatación pupilar, el aumento de la frecuencia y de la contractilidad cardíaca, la vasoconstricción, el aumento de lipólisis, el aumento de gluconeogénesis y glucogenólisis, la disminución de la motilidad y de la secreción del tracto gastrointestinal, la contracción de los esfínteres y el aumento de la sudoración. El SNS es el responsable de los cambios en la FC debidos a estrés físico y mental (Pumprla *et al.*, 2002; Capdevila y Niñerola, 2006). La función cardíaca saludable se caracteriza por el tiempo irregular de intervalos entre latidos cardíacos consecutivos (Moss, 1995). Esta variabilidad es el resultado de la oscilación rítmica de los componentes reguladores de la actividad cardíaca que funcionan para mantener la homeostasis cardiovascular dentro de un rango definido y a la concertación de las respuestas a los desafíos (Akselrod, 1995; Cerutti *et al.*, 1995).

La frecuencia cardíaca, en cualquier punto en el tiempo en individuos sanos, representa la interacción neta entre la regulación vagal (que reduce la FC) y la regulación simpática (que aumenta la FC) (Hainsworth, 1995; Kleiger *et al.*, 1995). Un aumento en FC es causado principalmente por un incremento en la actividad simpática, pero también puede resultar por una disminución en la regulación vagal o por cambios simultáneos en ambos sistemas regulatorios (Hainsworth, 1995).

La VRC, es decir, las fluctuaciones a corto plazo en la frecuencia cardíaca, reflejan el equilibrio del sistema simpático y parasimpático, usado como un indicador para la respuesta al estrés del SNA (Schmidt *et al.*, 2010). La manera habitual de medir esta variabilidad es a partir del electrocardiograma (ECG), donde se detecta cada una de las ondas R y se calcula el tiempo entre las diferentes ondas R

consecutivas o intervalo RR. Este intervalo RR mide el período cardíaco y la función inversa mide la FC. La serie de intervalos RR es lo que llamamos VFC (Rodas *et al.*, 2008) [Fig. 2]. Las ondas más prominentes son las llamadas ondas R que señalan la activación ventricular. Cada onda R indica un latido, por lo que el intervalo entre dos ondas (R-R) es el intervalo entre dos latidos (Migliaro *et al.*, 2004).



**Figura 2. Variación de la frecuencia cardíaca (FC) latido a latido.** A partir del ECG, se calcula el intervalo entre picos R-R y se expresa la variabilidad del ritmo cardíaco en segundos y la FC en latidos por minuto (p/m). Tomado de Rodas *et al.* (2008).

Erber *et al.* (2012) evaluaron la respuesta al estrés por medio de la VRC, cortisol y locomoción en yeguas que fueron separadas de su grupo social para poder iniciar un programa de entrenamiento específico; siguieron la evaluación por 4 días antes y 5 días después de la movilización y observaron que hubo un incremento de la FC durante 60 minutos, así como un incremento en sus niveles de cortisol salival que persistió durante 6 horas. Aunque no existió diferencia significativa en la VRC post-movilización, los autores concluyen que la estabulación individual de caballos puede ser un factor de estrés transitorio. Tanto la separación de sus congéneres familiares y la reducción de su espacio, son considerados estresores potenciales, ya que las yeguas estabuladas en caballerizas individuales se mueven menos que cuando se mantienen en un grupo (Erber *et al.*, 2012).

Por otro lado, Rietmann *et al.* (2004) estudiaron las respuestas de comportamiento y respuestas fisiológicas de 20 caballos “warmblood”, con respecto a una actividad de ejercicio intenso, por medio de la FC y la VRC, así como por sus

diferentes parámetros: la desviación estándar de los intervalos entre latido a latido (SDRR), la frecuencia baja (LF; tono simpático), la frecuencia alta (HF; tono parasimpático) y su relación (LF / HF; índice que representa el equilibrio simpático-vagal). Los caballos fueron obligados a moverse hacia atrás de forma continua durante 3 min de acuerdo con un protocolo normalizado y observaron que todos los cambios fueron significativos, además encontraron correlaciones entre los parámetros de VRC, los comportamientos que indican estrés y la frecuencia cardiaca. Lo cual indica que ante una actividad estresante, existen respuestas tanto fisiológicas como de comportamiento que pueden ser monitoreadas de forma confiable por medio del análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (Rietmann *et al.*, 2004).

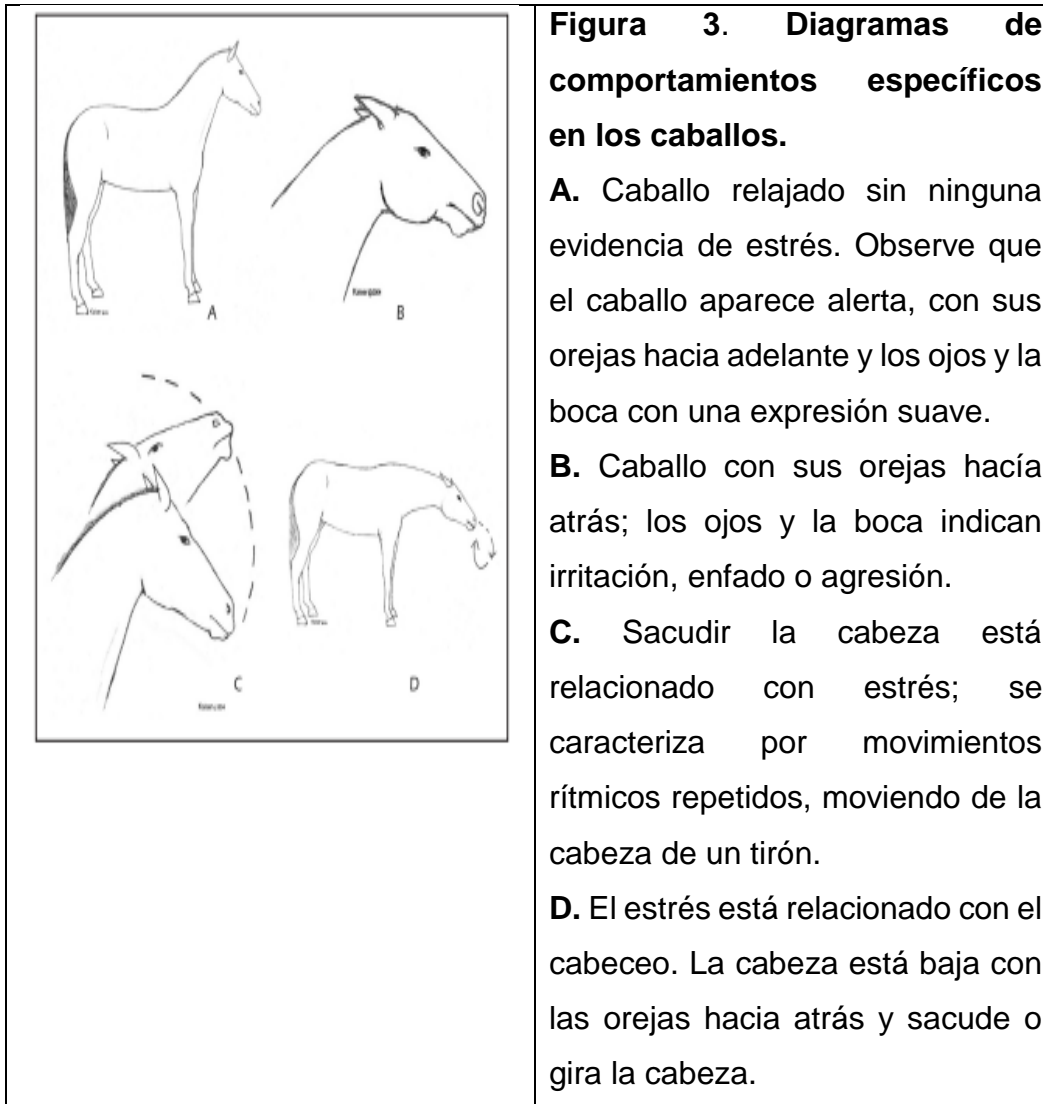
En resumen, la VRC mide las fluctuaciones en el corto plazo que hay en el intervalo entre un latido y el siguiente, es decir, mide el tono vagal; una disminución en la VRC refleja un dominio simpático, en tanto que valores altos, un dominio parasimpático (von Borell *et al.*, 2007), por lo tanto, a mayor VRC, mayor resiliencia y menor estrés en el animal.

### **2.3.1.2. Cambios en el comportamiento ante el estrés**

El impacto del estrés en potros separados de sus madres a corto plazo o de forma permanente, se ha demostrado utilizando indicadores de comportamiento, tales como el aumento de la actividad motora general y vocalizaciones (Haupt *et al.*, 1984; Hoffman *et al.*, 1995; McGee y Smith, 2004). Cuando se estudió el efecto de un destete gradual en los caballos, que permite al potro retener acceso olfativo, visual y auditivo hacia la yegua, se concluyó que esta forma de destetar impone menos estrés conductual y fisiológico comparado con un destete abrupto (McCall *et al.*, 1987).

En los equinos son varios los comportamientos específicos considerados como indicadores de estrés, irritación o frustración (Weeks y Beck, 1996; McDonnell, 2003). Estos incluyen las siguientes posturas: orejas hacia atrás, levantar cabeza, voltear la cabeza hacia la derecha o a la izquierda, agitar cabeza, balanceo de cabeza, colgar la cabeza hacia abajo y defecar [Fig. 3] (Kaiser *et al.*,

2006). También son características de estrés las siguientes conductas: aerofagia, masticar madera, patear y agresión dirigida al operario (McDonnell y Haviland, 1995; Young *et al.*, 2012).



Tomada de Kaiser *et al.* (2006).

Haupt (2002) cuantificó el comportamiento de 10 yeguas al parir y durante breves separaciones de 5 minutos a la semana, durante 9 semanas. Las actividades realizadas hacia el potro por parte de la yegua durante el post-parto fueron en su mayoría, estimulación a mamar y olfateo; la respuesta de la yegua fue muy activa en los primeros 30 minutos post-parto, siendo la cabeza del potro la región corporal que recibió más el contacto materno. Al ser separados, ambos aumentaron su

actividad y vocalizaciones; sin embargo en la yegua la actividad fue disminuyendo conforme aumentó la edad del potro, mientras que en el potro, aumentó desde la semana uno a dos e igualmente disminuyó conforme a su edad.

### **2.3.2 Evaluación del sufrimiento o dolor mental (“grief pain”)**

La naturaleza estoica de los herbívoros no nos permite evaluar con precisión el dolor que padecen. Como un mecanismo de selección, es natural que escondan los signos de dolor y discomfort (Anil *et al.*, 2005).

El proyecto Animal Welfare Indicators (AWIN, por su acrónimo en inglés) es un protocolo diseñado para evaluar el bienestar animal y ayudar a mejorarlo. AWIN (2015), pone especial énfasis en el reconocimiento y la valoración del dolor, ya que el dolor es un área que con frecuencia carece de muchas evaluaciones de bienestar en los animales y sin embargo a menudo es clave cuando surgen problemas de bienestar. El protocolo AWIN (2015), además, ayuda a comprender las relaciones humano-équido, y evalúa el estado nutricional, movimiento corporal y anomalías en el paso, así como el estado de salud de los caballos.

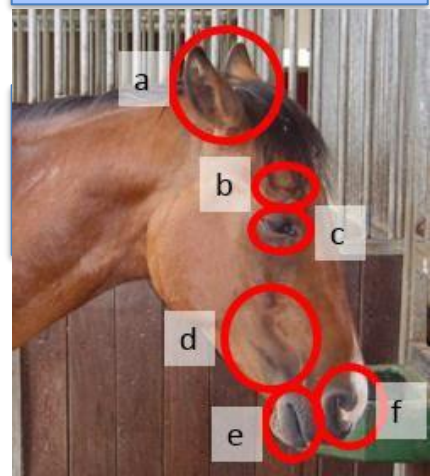
Es difícil conocer con certeza si los animales experimentan la pena, pesar o sufrimiento como el ser humano. Resulta razonable asumir que solo aquellos animales que forman vínculos sociales complejos con sus co-específicos puedan experimentar pena como resultado de la ruptura de dicho vínculo (McGrath *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios neurocientíficos sugieren que los mamíferos tienen mecanismos cerebrales que median las reacciones de sufrimiento (Panksepp y Watt, 2001). El avance más reciente en el reconocimiento de los cambios de comportamiento asociados con el dolor es la investigación de las expresiones faciales (Gleerup *et al.*, 2014). Éstas se utilizan comúnmente para evaluar el dolor y otros estados emocionales en los seres humanos, en particular en aquellos que son incapaces de comunicarse de manera coherente con sus médicos —por ejemplo, aquellos con deterioro cognitivo y los recién nacidos— (Grunau y Craig, 1987).



La escala gestual del caballo (HGS: *Horse Grimace Scale*, por sus siglas en inglés) —herramienta empleada en el protocolo AWIN (2015)— es un método estandarizado para evaluar los cambios en la expresión facial de un caballo debidos al dolor mental, pesar (“*grief pain*”) o sufrimiento. Dicho protocolo se vale de fotografías faciales [Fig. 4] de la yegua, tomadas durante un minuto y permite evaluar la presencia de:

- a. Orejas rígidas y hacia atrás
- b. Tensión por arriba de la zona de los ojos
- c. Rigidez orbital
- d. Músculos de masticación prominentes y tensos
- e. Boca tensa y barbilla pronunciada
- f. Fosnas nasales tensas y aplanamiento del perfil

**Figura 4.** Cambios en la expresión facial en un caballo debido al dolor. Tomado de AWIN (2015), *Welfare Assessment Protocol for Horses*. DOI: 10.13130/AWIN\_HORSES\_2015



En la **Figura 5** se muestra cómo calificar la escala gestual de dolor en caballos.

**Figura 5. Calificación de la escala gestual de dolor en caballos.**

			<p>Las <b>orejas están rígidas y hacia atrás</b>. Como resultado, el espacio entre las orejas puede aparecer más amplio respecto al valor basal.</p>
<p>No está presente (0)</p>	<p>Moderadamente presente (1)</p>	<p>Evidentemente presente (2)</p>	<p><b>Tensión alrededor del ojo.</b> La contracción de los músculos en la zona superior del ojo causa un aumento de la visibilidad de las superficies óseas, más prominentes. Si el hueso crestotemporal es visible con claridad, debería codificarse como "evidente-mente presente" o con una puntuación de 2.</p>
			<p><b>Tensión alrededor del ojo.</b> La contracción de los músculos en la zona superior del ojo causa un aumento de la visibilidad de las superficies óseas, más prominentes. Si el hueso crestotemporal es visible con claridad, debería codificarse como "evidente-mente presente" o con una puntuación de 2.</p>
<p>No está presente (0)</p>	<p>Moderadamente presente (1)</p>	<p>Evidentemente presente (2)</p>	<p><b>El párpado</b> está parcial o completamente cerrado. Cualquier cierre de los párpados que reduce el tamaño de los ojos por más de la mitad debería calificarse como "evidentemente presente" ó 2.</p>
			<p><b>El párpado</b> está parcial o completamente cerrado. Cualquier cierre de los párpados que reduce el tamaño de los ojos por más de la mitad debería calificarse como "evidentemente presente" ó 2.</p>
<p>No está presente (0)</p>	<p>Moderadamente presente (1)</p>	<p>Evidentemente presente (2)</p>	<p><b>Maseteros prominentes.</b> Los músculos de la masticación (maseteros) son visibles como un aumento de la tensión por encima de la boca. Si los músculos maseteros son claramente prominentes y reconocibles, la puntuación debe ser codificada como "evidentemente presente" ó 2.</p>
			<p><b>Maseteros prominentes.</b> Los músculos de la masticación (maseteros) son visibles como un aumento de la tensión por encima de la boca. Si los músculos maseteros son claramente prominentes y reconocibles, la puntuación debe ser codificada como "evidentemente presente" ó 2.</p>
<p>No está presente (0)</p>	<p>Moderadamente presente (1)</p>	<p>Evidentemente presente (2)</p>	<p><b>Maseteros prominentes.</b> Los músculos de la masticación (maseteros) son visibles como un aumento de la tensión por encima de la boca. Si los músculos maseteros son claramente prominentes y reconocibles, la puntuación debe ser codificada como "evidentemente presente" ó 2.</p>

			<b>Boca tensa y barbilla pronunciada.</b> La tensión en la boca es claramente visible cuando el labio superior se retrae y el labio inferior causa una barbilla pronunciada.
No está presente (0)	Moderadamente presente (1)	Evidentemente presente (2)	
			<b>Ollares tensos y perfil plano.</b> Los ollares se ven tensos y ligeramente dilatados, el perfil de la nariz se aplanan y los labios se alargan.
No está presente (0)	Moderadamente presente (1)	Evidentemente presente (2)	

Tomado de Welfare Assessment Protocol for Horses. DOI: 10.13130/AWIN\_HORSES\_2015).

La puntuación para la escala gestual del caballo se determina sumando las puntuaciones individuales de cada una de las seis unidades de gestos identificados (orejas rígidas y hacia atrás, tensión por arriba de la zona de los ojos, endurecimiento orbital, músculos de masticación prominentes y tensos, boca tensa y barbilla pronunciada, y fosas nasales tensas y aplanamiento del perfil) en cada imagen. En consecuencia, la puntuación máxima posible de HGS, será de 12 (es decir, una puntuación de 2 para cada uno de los 6 niveles) (Dalla Costa *et al.*, 2014).

Otro criterio conductual que se ha empleado como indicador de estrés en ganado, es la tasa de parpadeo. Un aumento en la EBR (“*Eye Blink Rate*”, por sus siglas en inglés), está asociado con ansiedad, falta de concentración y disminución del rendimiento en el ser humano; además, las tasas de EPR están correlacionadas positivamente con los niveles de dopamina. Hallazgos de Sylvia *et al.* (2014), sugieren que este indicador también se podría emplear para evaluar si los caballos están estresados.

### **2.3.3 Vocalizaciones**

Las vocalizaciones de los animales constituyen otro indicador no invasivo de medición de estrés. Las vocalizaciones, cantos y señales sonoras, son sonidos que estudia la bioacústica, apoyada de los conceptos fundamentales de la física del sonido, que analiza las características de la onda sonora. Se define al sonido como una vibración que se propaga en un medio elástico y que se transmite por los cuerpos sólidos, líquidos o los gases. La intensidad es la fuerza que tenga el movimiento vibratorio; el tono, es una magnitud subjetiva y se refiere a la altura o gravedad de un sonido, mientras que la frecuencia es una magnitud objetiva y mensurable referida a formas de onda periódicas que corresponde al número de vibraciones dobles que tengan lugar durante el período de un segundo. La unidad es el ciclo o Hercio (Hz) y el timbre indica la calidad del sonido (Arch, 2012).

En general, el sonido está compuesto por la suma de diferentes frecuencias, si el sonido solo contiene una frecuencia se le llama tono puro, pero si un sonido no está formado sólo de una frecuencia, sino por la suma de otras que son múltiplos de la fundamental, estas otras frecuencias varían en intensidad y son llamadas armónicas (Gonzalo *et al.*, 1992; Kumate *et al.*, 1994; Wesley *et al.*, 1998; citados por Arch, 2012).

El estudio de las variables relacionadas con el comportamiento acústico es un método no invasivo utilizado en las investigaciones de bienestar de las especies silvestres. En los caballos, las vocalizaciones pueden ser analizadas por un software de análisis de sonido, donde los parámetros acústicos se podrían utilizar para indicar el estado fisiológico de un individuo y, posiblemente, su estado emocional. En equinos las llamadas que se dan por los potros y madres separadas, o mediante sementales separados de su grupo, se pueden clasificar como afiliativas o llamadas de separación, especialmente si el grupo siguió estas vocalizaciones (Alberghina *et al.*, 2014).

Las llamadas de separación en los caballos son predominantemente '*nickers*', esto es, sonidos que se producen con la boca cerrada y la nariz extendida; son de

amplitud baja o media (Yeon, 2012; Alberghina *et al.*, 2014) y su duración varía de 0.2 a 1.7 seg. (Waring, 2003). A su vez, Alberghina *et al.* (2014) observaron diferencias específicas significativas en la estructura de las llamadas de separación producidas por las yeguas y los potros. Curiosamente, se ha encontrado que las estructuras formantes de los “*nickers*”, son características de un individuo en particular (Yeon, 2012; Alberghina *et al.*, 2014).

Los relinchos son los sonidos más largos y más fuertes de los caballos, que pueden detectarse a una distancia de 1 Km. (Waring, 2003). El relincho se inicia con el caballo parpadeando y con la dilatación de las fosas nasales y durante el relincho; el caballo eleva su cabeza, abre la boca ligeramente, comúnmente siguiendo con las orejas y los ojos (McDonnell y Haviland, 1995; Waring, 2003). El relincho tiene una gran amplitud y longitud, varía entre 0.5 y 2.8 seg.; generalmente es más tonal que el “*nicker*” (relincho más suave y bajo), aunque la frecuencia fundamental puede variar entre 400 y 2000 Hz.

A menudo el relincho se escucha como una llamada de socorro cuando una yegua se separa de su potro o compañeros de pares; uno o dos individuos a menudo relinchan para mantener o recuperar el contacto (Waring, 2003; Feist y McCullough, 1976).

Moons *et al.* (2005), registraron las vocalizaciones de potros destetados a los 6 meses de edad. El rango de vocalizaciones el día pre-destete fue de 0 a 7 vocalizaciones por hora (con un promedio de  $0.05 \pm 0.02$ ), el día del destete, fue de 2 a 181 (con un promedio de  $37.35 \pm 0.23$ ), y durante el día post-destete, de 0 a 63 (con un promedio de  $13.69 \pm 0.26$ ), concluyendo que hubo más vocalizaciones el día del destete, especialmente en la mañana. McGee y Smith (2004) por su parte, en su estudio realizado con 57 potrillos, compararon el efecto del aislamiento y acompañamiento (de un observador), al momento de ser separados de su madre mientras le realizaban la prueba de receptividad sexual, observaron que los potrillos aislados vocalizaron en intervalos significativamente más cortos que aquellos que permanecieron acompañados (14.8 vs. 26.8 seg.,  $P < 0.001$ ).

Es bien conocido que cuando los animales vocalizan en exceso, se asocia a un incremento de ACTH y cortisol en plasma sanguíneo, y a su vez a estados de estrés prolongados, por lo que las respuestas acústicas de la mayoría de los animales están relacionadas con estímulos o respuestas que generan estrés, tales como: soledad, hambre y choque térmico en animales infantes, y en animales adultos, apareamiento y defensa, por lo que el estrés es fundamental en la producción de vocalizaciones (Arch, 2012). Por tanto, la mayoría de los trabajos que evalúan distrés por separación, toman en cuenta como variable la medición de vocalizaciones, ya sea el número, su frecuencia o el intervalo entre ellas.

## **OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el distrés ocasionado en la yegua ante su separación del potrillo en diferentes momentos.

### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar la variabilidad del ritmo cardíaco como indicador de respuesta fisiológica al distrés ante la separación de la yegua de su cría.
2. Evaluar el comportamiento de las yeguas mientras son separadas de sus crías.
3. Analizar los cambios de expresión facial en la yegua en respuesta a su separación del potro.
4. Evaluar y clasificar las vocalizaciones que emitan las yeguas durante la separación de sus crías.

## **4. HIPÓTESIS**

Las yeguas tendrán respuestas fisiológicas, de comportamiento y de vocalización, que indicarán distrés por la separación de sus crías.

Conforme avance la edad del potro, las respuestas de distrés por separación de la cría en las yeguas múltiparas se verán disminuidas, en caso de las primíparas se observarán en constante aumento.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES

El trabajo de campo se llevó a cabo en las instalaciones del Agrupamiento de la Policía Montada de la Ciudad de México, (Iztapalapa, Ciudad de México), donde se crían y entrenan caballos para el apoyo de los Cuerpos de Policía de la Ciudad de México (**Foto 1**).



**Fotografía 1. Policía montada de la CDMX** (cortesía de Samuel M.)

Las yeguas preñadas y las yeguas con potro de esta institución se alojan individualmente en caballerizas de 3 x 3 metros y diariamente salen al asoleadero (**Foto 2**), por un periodo no mayor a dos horas. Las yeguas son alimentadas diariamente con alfalfa y avena, tienen acceso *ad libitum* al agua y también son suplementadas.

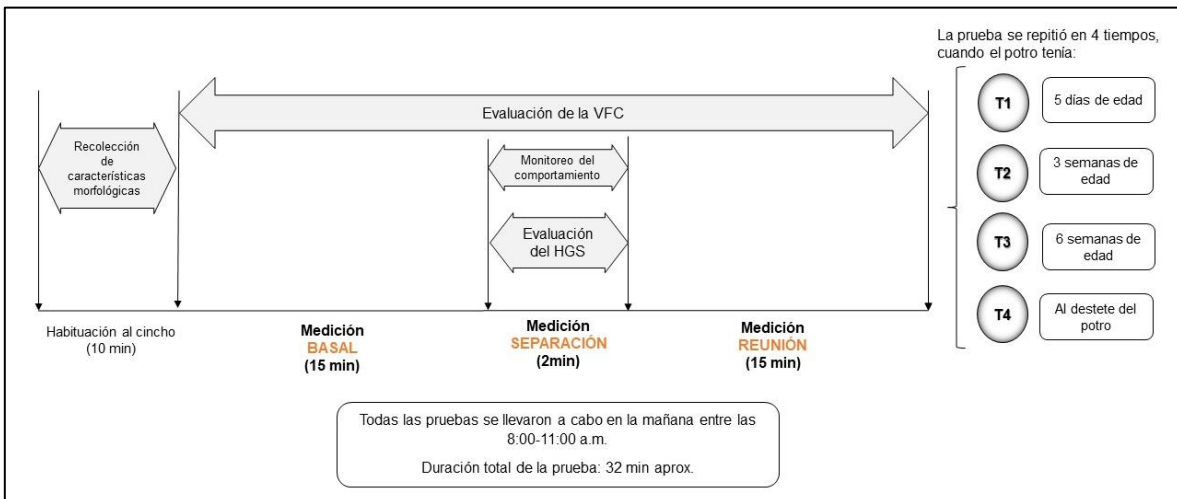


El personal del equipo veterinario valora clínicamente a las yeguas de acuerdo a su etapa fisiológica, por lo que se cuenta con los datos sobre la edad, la raza, la historia clínica y las crías de cada una de las yeguas.



**Fotografía 2. Yeguas y potros en el asoleadero.**

En el presente estudio se evaluó a 20 yeguas múltiparas de diferentes edades, de la raza Azteca. Cada yegua se puso a prueba en cuatro ocasiones, de acuerdo con el diseño experimental indicado en la **Figura 6**: cuando el potro tenía tres días, seis semanas, doce semanas de edad y al destete. Todas las pruebas se llevaron a cabo en la mañana entre las 8:00 y 11:00 horas.



**Figura 6. Diseño experimental.**

## 5.2 MÉTODOS GENERALES

Todos los pares de yegua-potro comenzaron las pruebas en sus caballerizas.

Para realizar las grabaciones de comportamiento se emplearon cámaras de vídeo (GoPro 4 Session y SONY HDR) sobre un tripié, fijas y colocadas en la parte delantera de la caballeriza (para las grabaciones faciales). El sistema de grabación de audio (micrófono Sennheiser ME66®; resp frec: 40-20,000 Hz) conectado a una grabadora de audio digital (TASCAM DR-40®; 96 KHz/24 bits) se instaló en un lugar que no fuera usado por personal de La Montada ni por los animales. Dicha zona fue en la parte exterior de la caballeriza, en un pasillo donde se evaluó a la yegua sin su potro (**Foto 3**) y en una caballeriza vacía aledaña, a 3 m. de la propia, donde la yegua no tuvo ningún contacto visual directo por su cuenta hacia el potrillo, aunque sí se encontraba dentro del rango audible con él.



**Fotografía 3. Caballerizas con el equipo de grabación.**

Previo al experimento las yeguas fueron equipadas con sensores de frecuencia cardíaca (Polar Equine V800 Science®). Después de un periodo de 10 min. de habituación se inició una grabación de 15 min. en ambos canales para establecer los valores basales. Las yeguas luego fueron llevadas a la caballeriza de separación destinada para el experimento. Después de escoltar a la yegua a la caballeriza de separación, el experimentador dejó la caballeriza, pero la siguió de cerca en caso de que la prueba tuviera que ser interrumpida. La separación de la madre de su potrillo duró 2 min., tiempo después del cual el experimentador tomó a

la yegua y la reunió de nuevo con su potrillo. El potro no se manejó de ninguna manera durante la prueba. La yegua y el potro fueron observados por otros 15 min. siendo grabados continuamente con el equipo de vídeo.

### 5.3 MEDICIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

A cada una de las yeguas se le midió la talla y se le determinó la condición corporal - que pudo ser una covariable importante en todos los análisis - empleando la escala de 0 a 5 de Carter *et al.* (2009). También se les calculó el peso corporal (**Foto 4**).



**Fotografía 4. Determinación de peso y altura de las yeguas.**

### 5.4 VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA

La frecuencia cardíaca y la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) fueron registradas empleando el equipo de telemetría Polar Equine V800 Science (Polar, USA) el cual fue colocado en la zona del tórax con el electrodo negativo del lado izquierdo a la altura del hombro, junto a la base del corazón en cada una de las yeguas del estudio.

La VFC fue analizada utilizando el software Kubios (Biomedical Signal Analysis Group, Dept. of Applied Physics, University of Kuopio, Finland). Se registraron cambios en las variables de la VFC durante la separación - para compararlos con las mediciones basales (primeros 15 min.) - y en la velocidad de recuperación, después de la reunión de la yegua con su potro (últimos 15 min.). Las variables calculadas fueron: desviación estándar de los intervalos de latido a latido (SDRR), el componente bajo (LF; tono simpático) y el de alta frecuencia (HF; el tono parasimpático) de la VFC y su relación (LF/HF; un índice que representa el equilibrio simpático-vagal). La SDRR se midió en milisegundos.

## 5.5 MEDICIONES DE COMPORTAMIENTO

Los comportamientos observados relacionados al estrés fueron basados en el etograma de Kaiser *et al.* (2006), que incluye: posiciones de las orejas, de la cabeza y la cola, movimientos, vocalizaciones, y las respuestas fisiológicas como la micción y defecación (**Cuadro 3**). Todos los videos fueron analizados por la misma persona utilizando el programa de Solomon Coder (2017). En cada variable de comportamiento se evaluó la latencia, frecuencia y duración.

**Cuadro 3. Comportamientos relacionados al estrés.**

Comportamiento	Descripción
<b>Alerta</b>	El caballo puede estar parado o caminando en postura de vigilancia con el cuello y la cola levantados; el cuello tenso, observando se alrededor; los ollares pueden estar dilatados; las orejas pueden estar hacia arriba, apuntando hacia adelante, puede ser unilateral o bilateral; los ojos bien abiertos mostrando la esclerótica (MacDonnell y Haviland, 1995; Heleski <i>et al.</i> , 2002; Waring, 2003; McGreeve, 2004; Mills, 2005).
<b>Cola elevada</b>	El caballo eleva la parte carnosa de la cola, extendida horizontalmente o elevada sobre la horizontal (Young <i>et al.</i> , 2012).
<b>Movimiento de cola</b>	El caballo realiza fuertes movimientos laterales y dorso-ventrales de la cola, más allá del simple balanceo rítmico (McGreevy, 2004; Hall <i>et al.</i> , 2014).
<b>Agitar la cabeza</b>	Rotación rápida y de un lado a otro de la cabeza, cuello y la región anterior del cuerpo, mientras los cascos están bien plantados en el suelo (Weeks, 1996; Haupt <i>et al.</i> , 2000; McDonnell, 2003; Waring, 2003; Hall <i>et al.</i> , 2013; Smiet <i>et al.</i> , 2014).

<b>Orejas hacia atrás</b>	Orejas hacia atrás sin estar completamente planas. El caballo deja las orejas fijas en esta posición por más de 5 segundos (MacDonnell y Haviland, 1995; Weeks, 1996; Houpt <i>et al.</i> , 2000; McDonnell, 2003; Waring, 2003; Ashley <i>et al.</i> , 2005; Smiet <i>et al.</i> , 2014).
<b>Cabeza elevada</b>	Tiene la cabeza más alta que en posición normal con la nariz extendida hacia arriba y con una ligera extensión del cuello (Keisser <i>et al.</i> , 2006).
<b>Sacudir la cabeza</b>	Hay movimientos rítmicos repetidos; los movimientos son de arriba abajo o laterales; puede echar la cabeza levemente al aire (Weeks, 1996; Houpt <i>et al.</i> , 2000; McDonnell, 2003; Waring, 2003; Mills, 2005; Keisser <i>et al.</i> , 2006; Hall <i>et al.</i> , 2013; Smiet <i>et al.</i> , 2014).
<b>Defecación</b>	Expulsión de las heces: contrae el esfínter anal rítmicamente y eleva la cola (Weeks, 1996; Houpt <i>et al.</i> , 2000; McDonnell, 2003; Waring, 2003; Young <i>et al.</i> , 2012; Smiet <i>et al.</i> , 2014).
<b>Exposición de la esclerótica</b>	El caballo muestra lo blanco del ojo por más de 5 segundos (Sandem <i>et al.</i> , 2002).
<b>Vocalizaciones</b>	Llamadas fuertes, prolongadas (por lo general de 1 a 3 segundos; relincho de tono alto y agudo que termina en un relincho más suave y bajo ('nicker'); la cabeza está elevada y la boca ligeramente abierta (MacDonnell y Haviland, 1995; Heleski <i>et al.</i> , 2002; Waring, 2003; Houpt, 2005; Mills, 2005; Hall <i>et al.</i> , 2014).

## 5.6. EVALUACIÓN DEL SUFRIMIENTO O DOLOR MENTAL

Durante la prueba de separación de sus potrillos, se observó la cara de cada yegua por un minuto y se evaluó la presencia de gestos específicos explicados en la escala gestual del equino (HGS, por sus siglas en inglés), desarrollada por AWIN (2012) (**Fig. 4**). La puntuación del HGS, se determina sumando las puntuaciones individuales para cada una de las seis unidades de gestos identificados en cada imagen. En consecuencia, la puntuación máxima total posible en el HGS es de 12, es decir, una puntuación máxima de 2 y mínima de 0 para cada uno de los 6 niveles (Dalla Costa *et al.*, 2014).

La evaluación del HGS fue analizada de los vídeos de grabación continúa obtenidos durante la medición de separación de la yegua de su potrillo, y posteriormente fue calificada siempre por una sola persona, la tesista.

## 5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las pruebas de normalidad de las variables medidas se llevaron a cabo mediante pruebas de Shapiro-Wilk.

Analizamos la repetibilidad del comportamiento de los individuos en los ensayos mediante correlaciones intra-clase basadas en Modelos Lineales Generalizados, calculadas como la proporción de variación fenotípica que se puede atribuir a la variación entre sujetos.

Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP), necesario para reducir el número de dimensiones en las pruebas con muchas variables. Con base en el tipo de datos, se utilizó el diseño adecuado de medidas repetidas (Modelos Generales Lineales y Mixtos, ecuaciones de estimación generalizadas, Friedman y ANDEVA).

La comparación de los resultados de las diferentes mediciones se realizó por los métodos apropiados correlativos. El análisis estadístico se calculó con el SPSS (v16.0 SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) y el programa estadístico R (2013).

Los resultados se presentan en medias y desviación estándar.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

En el **Cuadro 4** se aprecian las características morfológicas del grupo de yeguas evaluado en el estudio.

**Cuadro 4. Características morfológicas de las yeguas del estudio.**

<b>Id_yegua</b>	<b>Edad (Años)</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Alzada (cm)</b>	<b>No. de parto</b>	<b>Gestante</b>	<b>Id_potro</b>	<b>Sexo del potro</b>
B8	19	508	142.6	9	No	P57	M
E9	12	431	142	5	No	P62	M
I41	8	385	142	1	No	Q2	M
C11	14	463	142	5	Sí	Q3	H
I50	8	553	143.2	3	Sí	Q4	M
E17	12	571	150	6	Sí	Q5	H
A93	19	450	147	7	Sí	Q6	M
E15	12	526	147	7	Sí	Q7	H
H2	9	558	142	4	Sí	Q8	M
E3	12	463	142	5	Sí	Q9	H
I15	8	490	147	3	No	Q12	H
G39	10	472	145	5	No	Q13	M
E55	12	490	152	6	No	Q15	H
F4	11	455	145	6	No	Q17	M
D12	13	439	150	6	No	Q18	M
A83	18	490	140	11	No	Q24	M
955	21	553	147	10	No	Q25	M
I8	8	472	153	3	NO	Q26	H
C14	14	490	145	6	No	Q28	H
J11	7	599	157	2	Sí	Q29	H

7. \*Identificación (ID), Macho (M), Hembra (H).

## 6.2 VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA

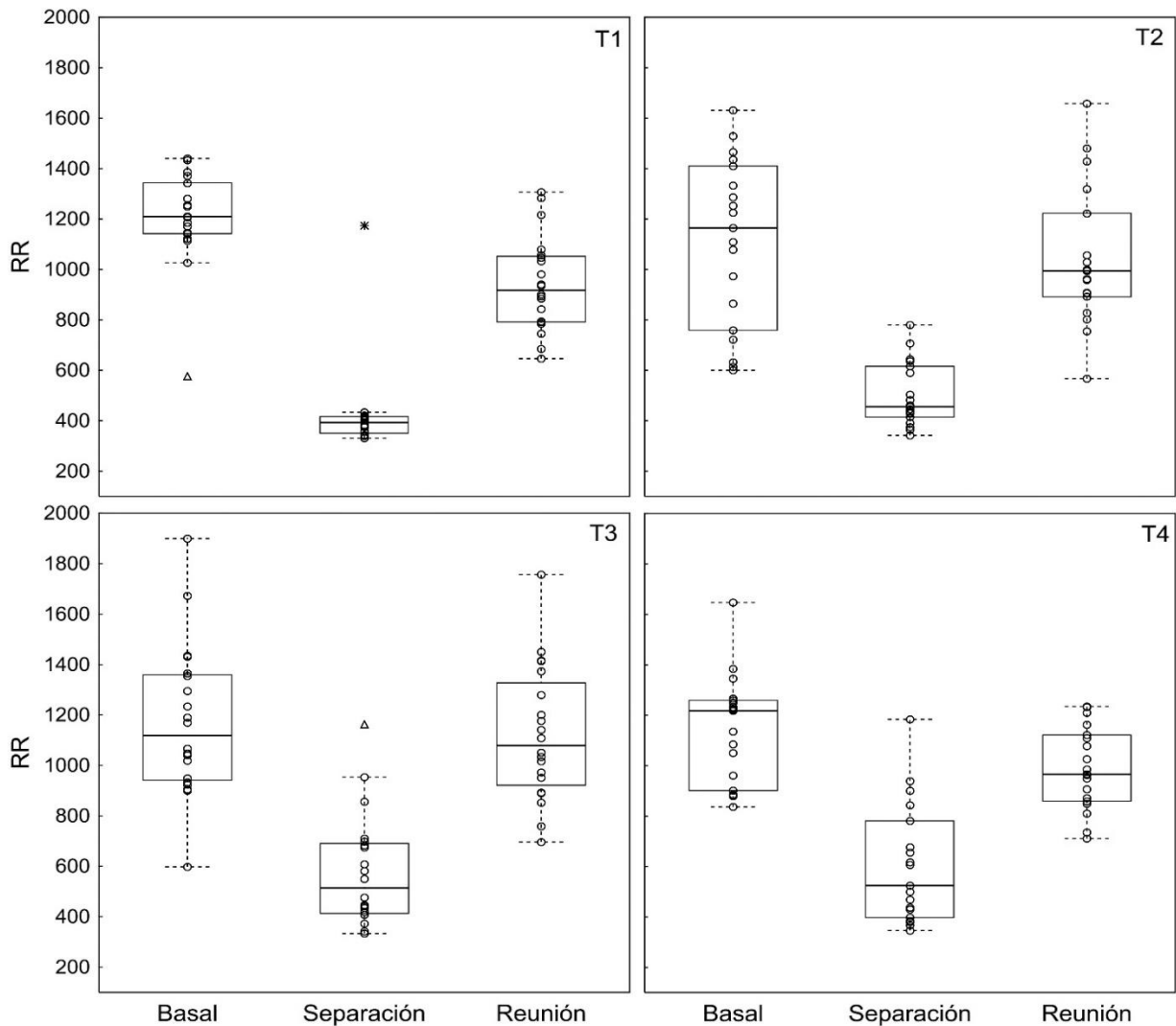
### 6.2.1 El intervalo RR

El intervalo RR de las yeguas durante la fase basal tuvo una gran variación (T1:  $1204 \pm 190$ , T2:  $1110 \pm 331$ , T3:  $1170 \pm 300$ , T4:  $1140 \pm 214$ ). Durante la separación este valor disminuyó considerablemente (T1:  $424 \pm 180$ , T2:  $502 \pm 124$ , T3:  $576 \pm 222$ , T4:  $602 \pm 234$ ) y retornó a valores cercanos a los basales en la fase de reunión (T1:  $942 \pm 186$ , T2:  $1040 \pm 271$ , T3:  $1121 \pm 266$ , T4:  $988 \pm 162$ ).

El cambio en el intervalo RR durante la separación de las yeguas muestra la frecuencia cardiaca elevada como signo de distrés en todas las edades en las que se realizó la prueba.

El efecto ligeramente significativo de cada prueba y la interacción de los dos factores, indican que la influencia de la separación en los intervalos RR es diferente en las pruebas consecutivas (**Fig. 7**; Modelos Lineales Mixtos; part:  $\chi^2 = 368.6$ ,  $P < 0.001$ , test:  $\chi^2 = 3.84$ ,  $P = 0.05$ , part\*test:  $\chi^2 = 5.48$ ,  $P = 0.06$ ).





**Figura 7. Promedio de intervalos RR durante la medición basal, separación y reunión en las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

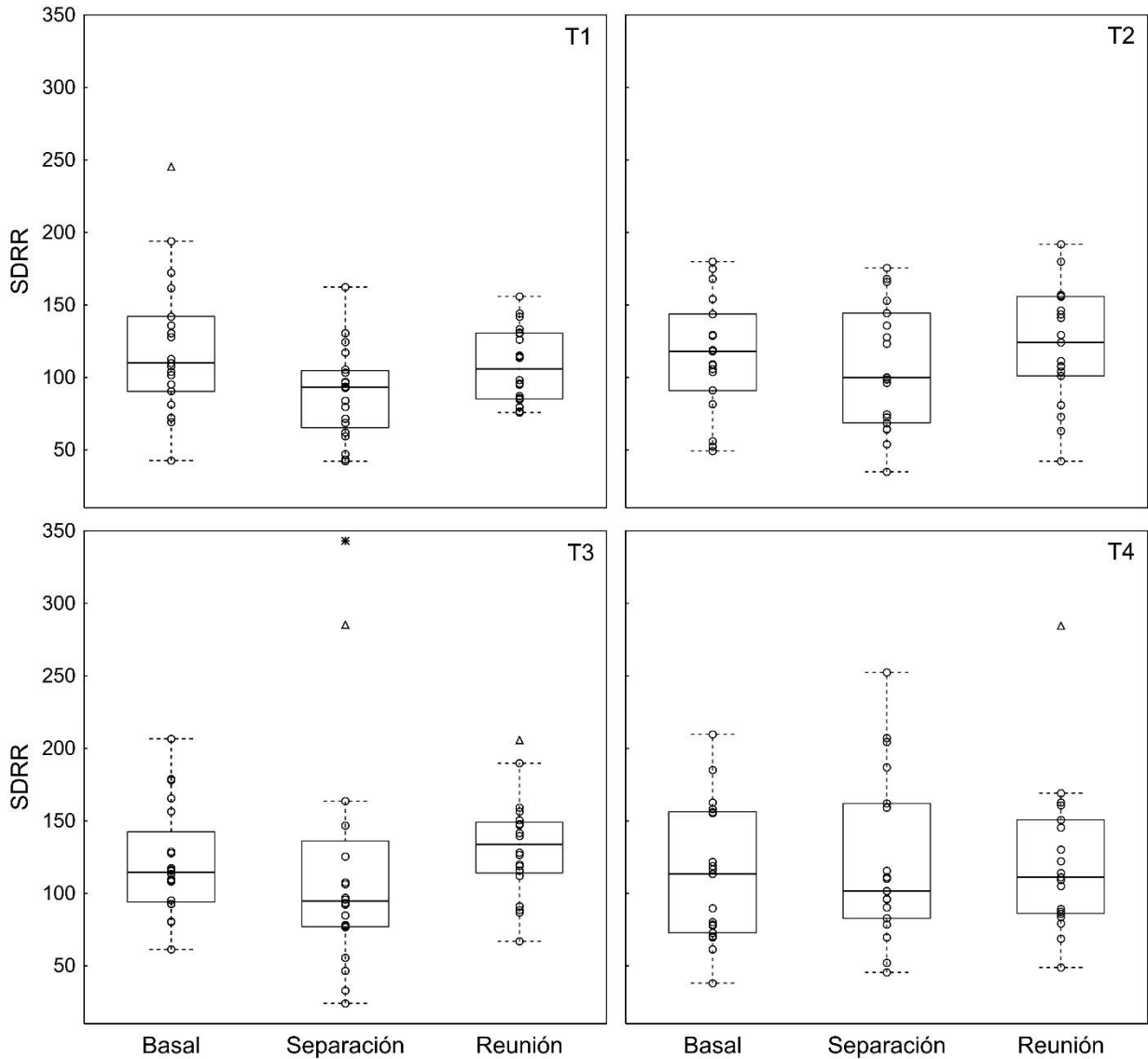
De acuerdo con Stucke *et al.* (2015) es difícil lograr condiciones experimentales estandarizadas en estudios con equinos, y por esta razón se dificulta lograr que la estimulación del SNA tenga correlaciones y cambios significativos con las mediciones de la VFC. Sin embargo, nosotros observamos que tan solo con 2 min. de separación de su potrillo, se vieran diferencias en los intervalos RR de las yeguas.

### 6.2.2 La desviación estándar de los intervalos RR (SDRR)

La desviación estándar de los intervalos RR fue más estable en todas las sesiones de prueba (Basal T1:  $120.8 \pm 47.9$ , T2:  $115.3 \pm 38.8$ , T3:  $123.6 \pm 37.9$ , T4:  $112.4 \pm 47.4$ ; Separación T1:  $88.9 \pm 31.0$ , T2:  $109.1 \pm 41.9$ , T3:  $127.3 \pm 102.7$ , T4:  $122.3 \pm 57.1$ ; Reunión T1:  $108.2 \pm 25.5$ , T2:  $121.9 \pm 39.7$ , T3:  $131.9 \pm 34.2$ , T4:  $121.5 \pm 52.1$ ).

No se encontraron diferencias significativas por efecto de la separación y tampoco las hubo en las repeticiones de las pruebas, para la desviación estándar de las desviaciones de los intervalos RR (**Fig. 8**; Modelos Lineales Mixtos; part:  $\chi^2 = 1.75$ ,  $P = 0.41$ , test:  $\chi^2 = 3.48$ ,  $P = 0.06$ , part\*test:  $\chi^2 = 4.41$ ,  $P = 0.11$ ).

La desviación estándar del intervalo RR es un indicador de la variabilidad general. Estudios previos donde se investigaba el estrés en caballos indican que la SDRR disminuye ante intervenciones estresantes (Rietmann *et al.*, 2004b; Vitale *et al.*, 2013; McConachie *et al.*, 2015). Sorpresivamente en nuestro estudio la SDRR se mantuvo sin cambios y sin embargo sí hubo una reducción en la media de RR, como ha sido observado en caballos estresados según Visser *et al.* (2002). Sin embargo, el ACP mostró que el cambio en el intervalo RR fue inversamente proporcional a la desviación estándar del intervalo RR.

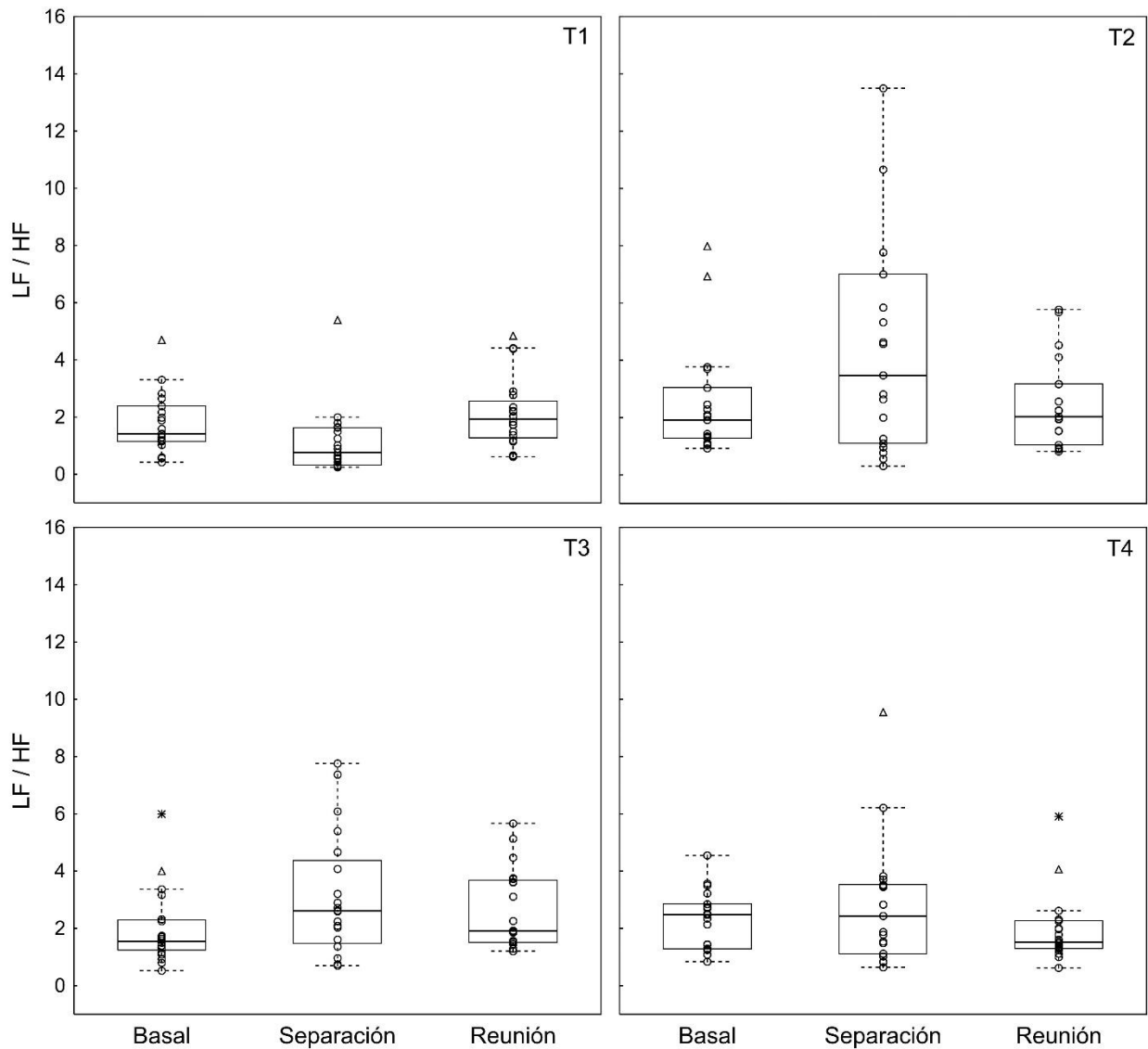


**Figura 8. Desviación estándar media de los intervalos RR (SDRR) durante la medición basal, separación y reunión en las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

### 6.2.3 La relación LF / HF

Existen diversos estudios que han demostrado la utilidad de la relación LF / HF como un indicador de la actividad simpática durante una situación de estrés físico y psicológico con un aumento en dicha relación, que se interpreta como un cambio regulatorio hacia una posición predominantemente simpática (von Borell *et al.*, 2007).

Sin embargo, ante la separación de la yegua de su potrillo, no logramos observar un efecto consistente en la relación LF / HF (**Fig. 9**; Modelos Lineales Mixtos; part:  $\chi^2 = 5.35$ ,  $P = 0.07$ , test:  $\chi^2 = 2.06$ ,  $P = 0.15$ , part\*test:  $\chi^2 = 2.81$ ,  $P = 0.24$ ). Los valores obtenidos fueron: Basal T1:  $1.78 \pm 1.06$ , T2:  $2.48 \pm 1.95$ , T3:  $1.96 \pm 1.30$ , T4:  $2.30 \pm 1.00$ ; Separación T1:  $1.14 \pm 1.18$ , T2:  $4.34 \pm 3.63$ , T3:  $3.10 \pm 2.15$ , T4:  $2.79 \pm 2.16$ ; y Reunión T1:  $2.14 \pm 1.23$ , T2:  $2.48 \pm 1.56$ , T3:  $2.65 \pm 1.38$ , T4:  $1.95 \pm 1.22$ .



**Figura 9. Proporción de las frecuencias baja / alta (LF / HF, por sus siglas en inglés) durante la medición basal, separación y reunión en las cuatro pruebas (edades). Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior**

(cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

#### **6.2.4 Repetibilidad de la respuesta al estrés**

Dado que la respuesta de estrés a la separación del potro se reflejó únicamente en la media de los intervalos RR, sólo probamos la repetibilidad entre las pruebas para esta variable. La repetibilidad del cambio en las medias de los intervalos RR se calculó utilizando una correlación intra-clase basada en un Modelo Lineal Mixto con máxima verosimilitud restringida. Para las correlaciones se evaluaron los intervalos de confianza del 95% por 1000 muestra bootstrap. La identidad individual se utilizó como un factor aleatorio. Los valores de  $P$  se calcularon por 1,000 permutaciones.

La repetibilidad del cambio en RR fue significativa pero muy débil ( $R = 0.135$ ,  $CI = [0.031, 0.265]$ ,  $P < 0.01$ ). En términos generales, la respuesta simpático-vagal de las yeguas ante la separación de sus potrillos indicada por la evaluación de la VFC (RR y LF/HF) presentó una tendencia a disminuir conforme avanzó la prueba (edad de los potrillos).

Varios estudios han mostrado la utilidad de la proporción LF/HF para definir el bienestar y cuantificar el grado de estrés psicológico que tienen los caballos bajo diferentes tareas; un aumento de dicha tasa se interpreta como un cambio regulatorio hacia el dominio del simpático (Kuwahara *et al.*, 1999; von Borell *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio las proporciones LF/HF ante la separación de los potrillos, mostraron un grado de variabilidad individual muy grande entre las yeguas. De forma similar, von Borell *et al.* (2007) indican que los valores basales de VFC presentan grandes diferencias individuales en los caballos. Esto pudo haber contribuido a la falta de significancia en los valores de SDRR y proporción de LF/HF obtenidos en el presente estudio. Clément y Barrey (1995) observaron gran variabilidad en yeguas comparado con potrancas, y una baja respuesta al estrés fue observada por Schönborn *et al.* (2015), en yeguas lactantes.

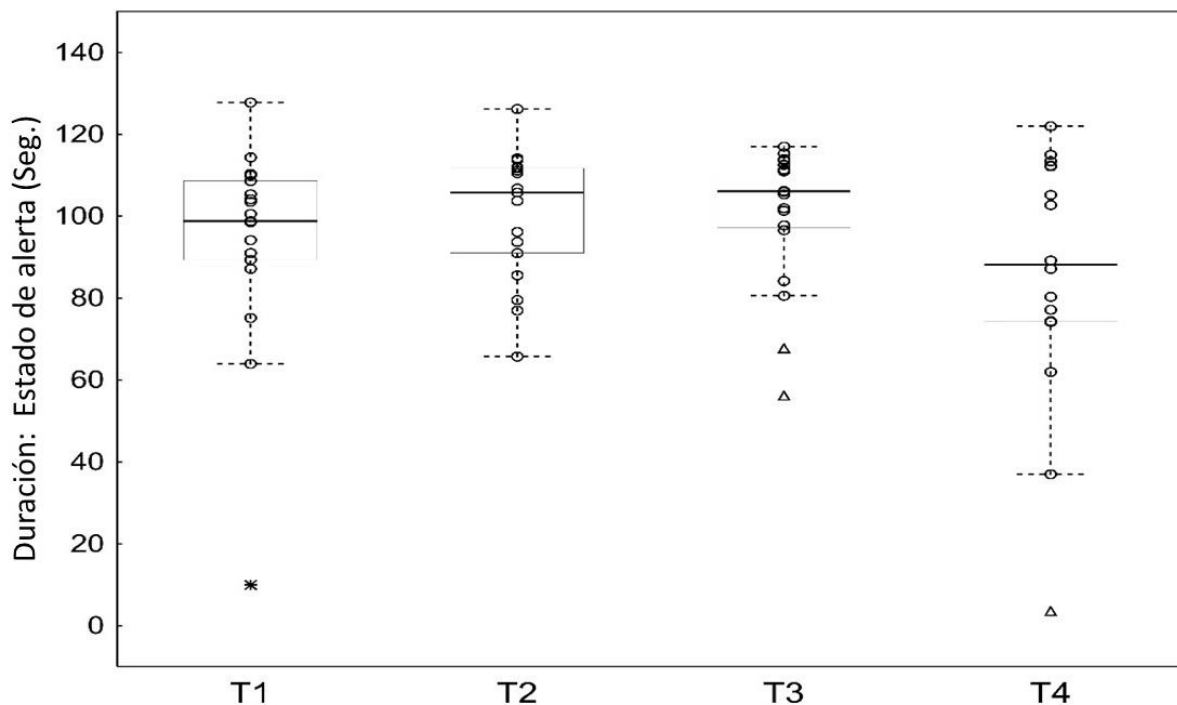
La respuesta de estrés psicológico ante la separación del potrillo fue menos pronunciada de lo que se ve en caballos transportados por carretera (Rietmann *et*

al., 2004a), y también menor a la de los potrillos al destete (Erber *et al.*, 2012b), o a la de yeguas separadas de su manada (Erber *et al.*, 2013). La falta de cambios en la SDRR y la RMSSD en respuesta a la separación del potrillo sostiene el hallazgo de que este procedimiento es solo un estresor leve bajo las condiciones de nuestro estudio.

### 6.3 EL COMPORTAMIENTO

#### 6.3.1 Duración del estado de alerta (Atenta a + caminar “alerta”)

La duración del estado de alerta de las yeguas tuvo un efecto negativo de la edad [Fig. 10; Modelo Lineal General Mixto, distribución de Poisson (porque no está distribuida normalmente y la identificación de las yeguas es un factor aleatorio),  $\chi^2 = 4.06$ ,  $P < 0.05$ ]. Esta variable no obtuvo ninguna repetibilidad,  $R = 0$ ,  $CI = [0, 0, 186]$ ,  $P = 1.0$ .



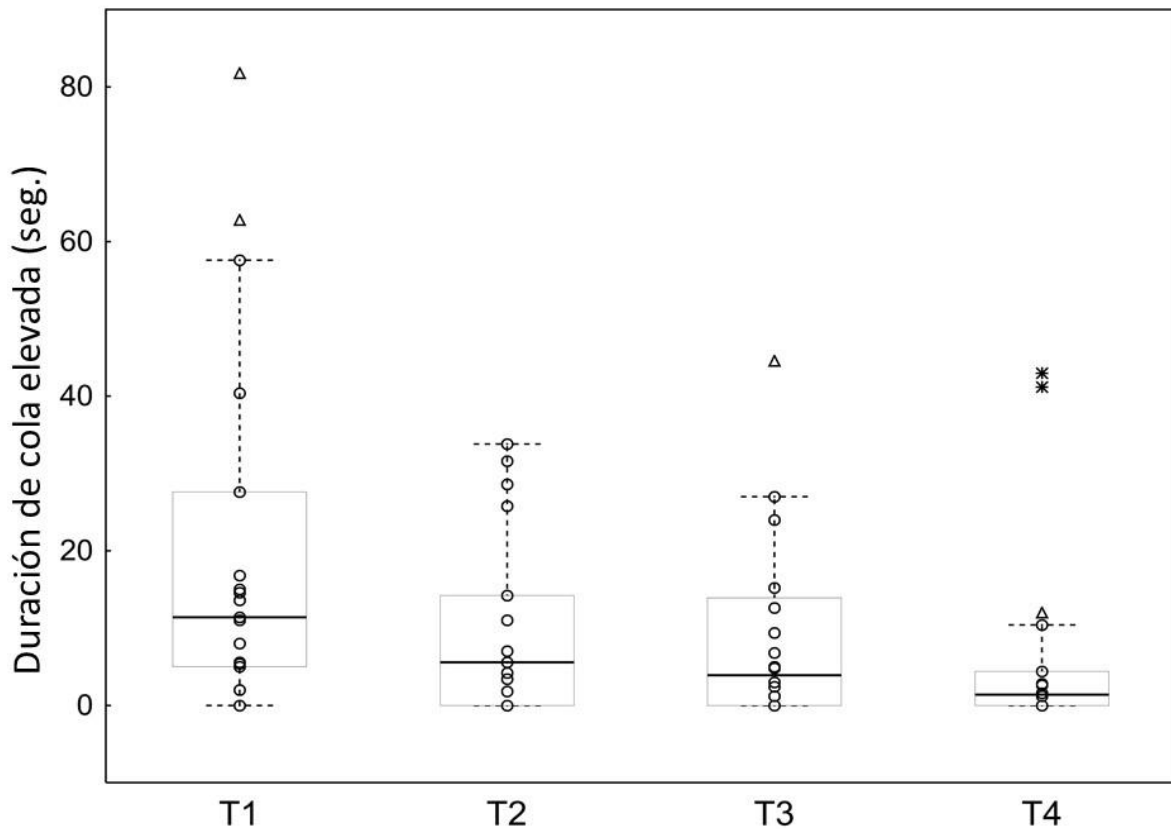
**Figura 10. Duración del estado de alerta (seg.) durante las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se

indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

### ***Duración de la “cola elevada”***

Para este indicador, igualmente hubo un efecto negativo de la edad [**Fig. 11**, Modelo Lineal General Mixto, distribución de Poisson (porque no se distribuye normalmente, la identificación de las yeguas es un factor aleatorio),  $\chi^2 = 91,44$ ,  $P < 0.001$ ].

La cola elevada tuvo una buena repetibilidad:  $R = 0.69$ ,  $CI = [0.414, 0.842]$ ,  $P < 0.001$  LRT, 0.212 permutaciones.



**Figura 11. Duración de cola elevada (seg.) durante las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

### 6.3.3 Otras variables conductuales

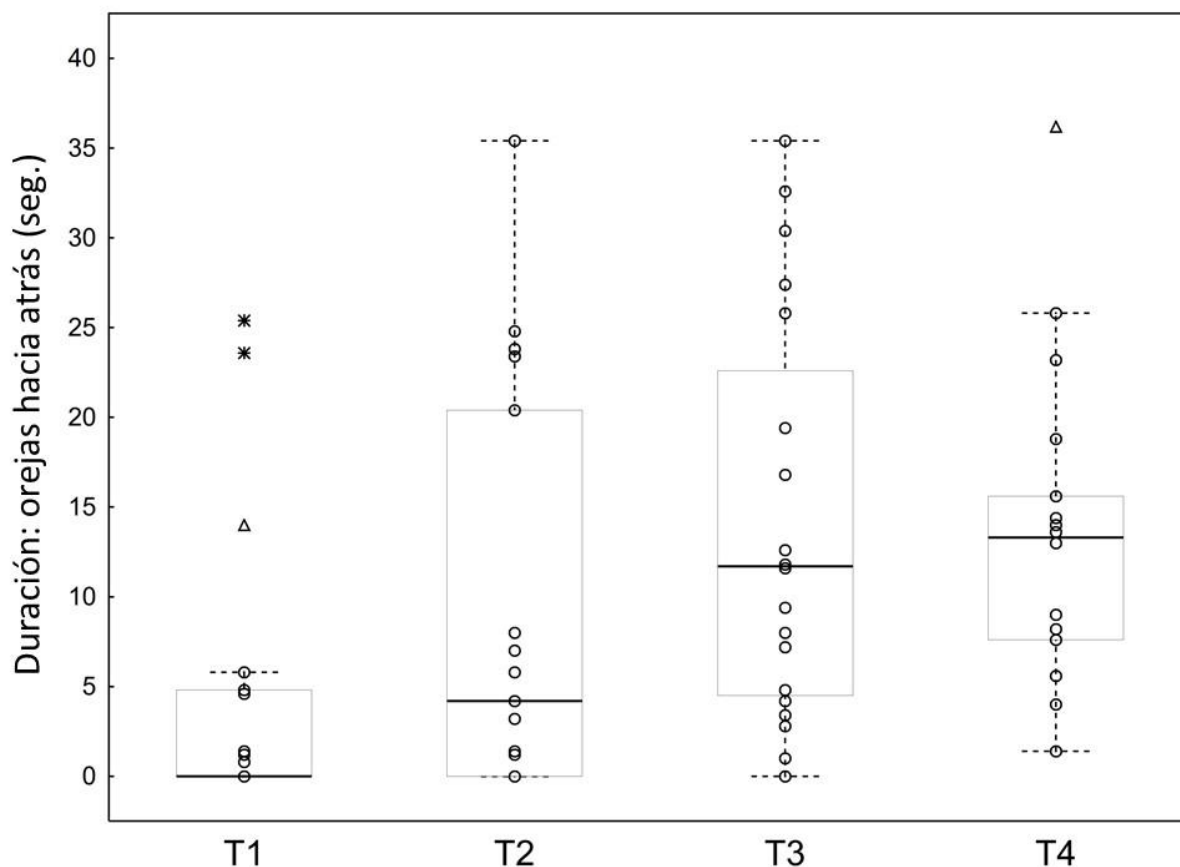
#### **Movimiento de la cola**

Se observó la presencia de “agitar la cola” y como en las demás variables conductuales, fue disminuyendo conforme aumentaba la edad del potro. Rietmann *et al.* (2004) mencionan que agitar la cola, sobre todo cuando no hay insectos presentes, se puede expresar como la incertidumbre y el descontento que pueden experimentar, como el miedo o la agresividad (Huff, 1988; Budd, 1996; Grandin, 1997; Roberts, 2002). Sin embargo, Reitmann *et al.* (2004b) indican que esta conducta tiene poca relación con parámetros de la VFC.

**Sacudir la cabeza** (frecuencia): Casi nunca ocurrió ( $0.365 \pm 0.75$ ; máx. = 4, min = 0).

**Orejas hacia atrás** (duración): Aumentó conforme avanzó la edad (**Fig. 12**; MLGM,  $\chi^2 = 86.73$ ,  $P < 0.001$ ), sólo T1 difirió de los otros tiempos de la prueba.





**Figura 12. Duración de orejas hacia atrás (seg.) durante las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

**Cabeza elevada** (frecuencia): Se obtuvieron valores muy bajos ( $0.78 \pm 0.73$ ; máx. = 3, min. = 0), probablemente por error de codificación: ya que 'cabeza elevada' no fue codificada cuando el animal estaba en 'atenta a' o 'caminar alerta'.

**Agitar la cabeza** (frecuencia): También en esta conducta se obtuvieron números bajos de ocurrencias,  $0.84 \pm 1.47$ ; máx. = 8, min = 0.

**Micción y defecación:** Si bien en nuestro estudio, algunas yeguas presentaron defecación y micción durante las pruebas, no fue de forma significativa.

La defecación se observa comúnmente cuando hay tensión y miedo (Schäfer, 1978; Rietmann, 2004). En la medida que la cabeza y su musculatura se vuelve

tensa, el sistema simpático cobra fuerza (Parelli, 2000; Roberts, 2002; citados por Rietmann *et al.*, 2004), hasta que el animal pueda caer en pánico (Wolff *et al.*, 1997), similar a lo que se observó en este estudio; sin embargo, la frecuencia de movimientos agitando la cabeza fue escasa.

**Esclerótica expuesta:** El porcentaje de esclerótica visible, es un indicador de estados emocionales (Sandem *et al.*, 2002). Una exposición intensa y fija se ha observado en caballo con cojera (Dyson *et al.*, 2018) y se atribuye a miedo (McDonnell, 2003; von Borstel *et al.*, 2009). En el presente estudio 19 de 20 yeguas mostraron este signo ante la separación de sus potrillos (**Foto 5**).

#### 6.4 EVALUACIÓN DEL DOLOR MENTAL O SUFRIMIENTO

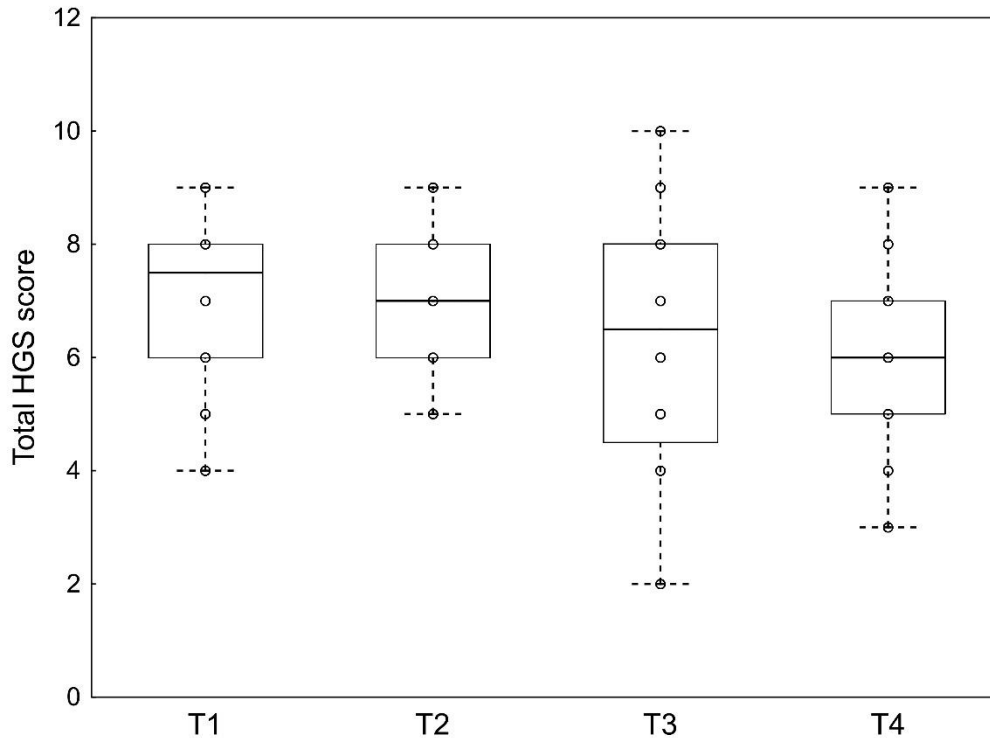
Las calificaciones de las yeguas ante el uso de la escala gestual para equinos (HGS), fueron de 2 a 10 (**Foto 5**).

No se observaron diferencias en las calificaciones obtenidas durante la separación a lo largo de las cuatro pruebas. (**Fig. 13**; Modelo Lineal Mixto, factor fijo: número de prueba; factor aleatorio: identificación de la yegua,  $\chi^2 = 2.43$ ,  $P = 0.12$ ). Recordemos que mientras más bajo sea el puntaje, menos signos de dolor mental, pena o sufrimiento padece el animal.

La calificación de HGS no obtuvo ninguna repetibilidad a lo largo de las pruebas,  $R = 0$ ,  $CI = [0, 0,139]$ ,  $P = 0.5$ .



**Fotografía 5. Expresión facial de la yegua A y de la yegua B, sometidas a la separación de su potro.**



**Figura 13. Calificación de la escala de dolor durante las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

Dalla Costa *et al.* (2017) sugieren que la escala HGS puede ser considerada como un indicador específico de evaluación de dolor en caballos. Sin embargo, en nuestro estudio pretendimos evaluar el sufrimiento mental a partir del uso de dicha escala en los gestos de las yeguas durante la separación de sus crías sin observar cambios. No obstante, sí se observaron cambios en las expresiones faciales al momento de la separación, indicados por una mayor visibilidad de la esclerótica de los animales, signo que no está contemplado en dicha escala y que ha sido asociado a expresiones de miedo en vacas (Sandem y Braastad, 2005). Por tanto, se requieren más estudios para relacionar el sufrimiento mental con dichas expresiones. La excitación positiva o negativa en equinos como lo pudo haber sido la reunión con los potrillos, pudiera ser una variable de confusión ya que los caballos muestran expresiones faciales discretas en un rango de contextos que reflejan estados emocionales (Wathan *et al.*, 2015).

Hasta donde sabemos, los reportes de respuesta de las yeguas ante la separación transitoria de sus potrillos, es escasa (e. g. Houpt, 2002). No así la respuesta de estrés del potrillo (Hoffman *et al.*, 1995; Heleski *et al.*, 2002; McGee y Smith, 2004; Moons *et al.*, 2005; Waran *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012). En estos estudios la respuesta es mucho más pronunciada que la que observamos en la yegua donde la respuesta disminuyó en la medida que la edad del potrillo aumentaba. Suponemos que se debe a que los potrillos se están acercando a la edad de destete y que la madre debe reducir su vínculo madre-cría para estar disponible en el aspecto reproductivo, pues como se sabe, dicho vínculo declina al aproximarse el destete (French, 1990; Estep *et al.*, 1993).

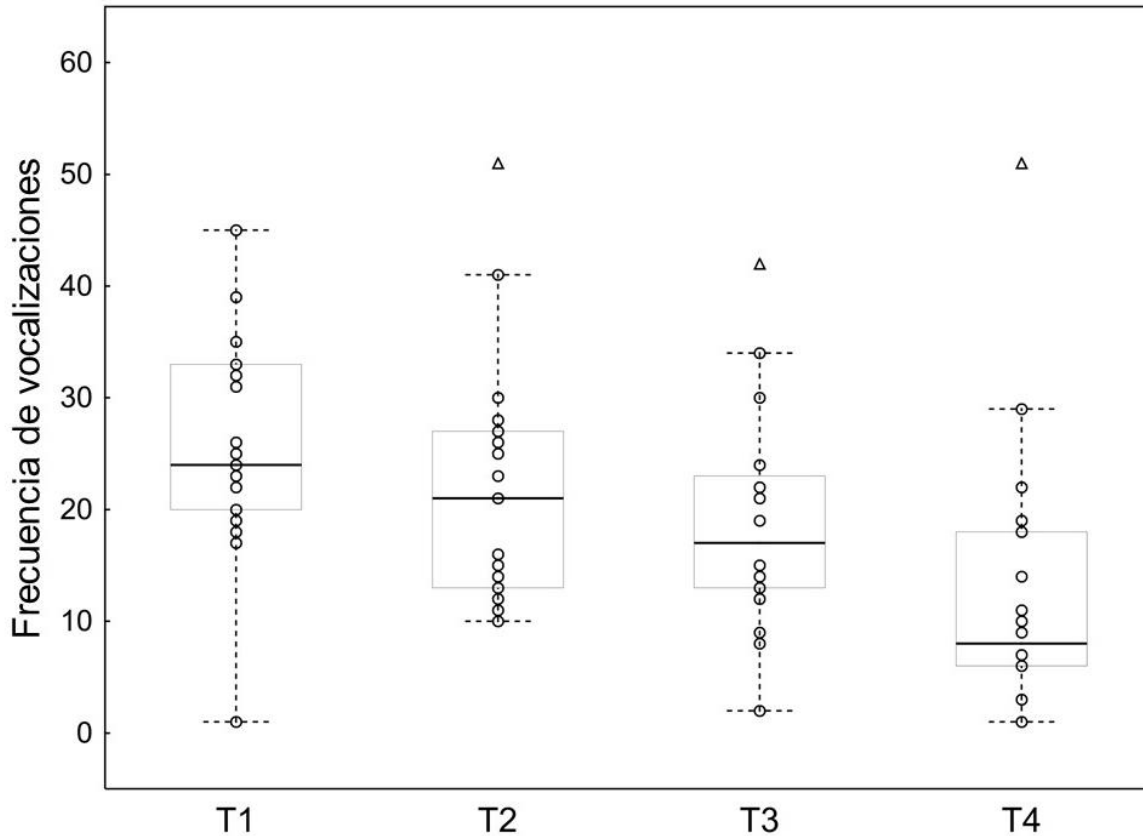
## 6.5 VOCALIZACIONES

En los equinos las vocalizaciones emitidas por los potros y madres separadas suelen ser clasificadas como afiliativas o de separación, especialmente si una reunión siguió a estas vocalizaciones (Alberghina *et al.*, 2014).

Se observó una disminución en la frecuencia de vocalizaciones, a medida que avanzaba la edad de los potrillos [**Fig. 14**; Modelo Lineal General Mixto, distribución de Poisson (porque es el conteo de datos y la identificación de las yeguas es un factor aleatorio),  $\chi^2 = 85.84$ ,  $P < 0.001$ ], lo que pudiera indicar que las madres están siendo más resilientes ante la separación de sus hijos.

Las vocalizaciones tuvieron una buena repetibilidad:  $R = 0.40$ ,  $CI = [0.096, 0.608]$ ,  $P < 0.05$ .

La frecuencia de vocalizaciones estuvo correlacionada positivamente con la duración del estado de alerta en las yeguas. McDonnell (2003) menciona que en los caballos es posible encontrar el relincho acompañado de la vigilancia o conducta alerta.



**Figura 14. Frecuencia (número) de vocalizaciones durante las cuatro pruebas (edades).** Se muestran como medianas (líneas horizontales), cuartiles superior e inferior (cajas), valores mínimos no atípicos y valores máximos no aleatorios (bigotes). También se indican puntos de datos crudos (círculos), valores atípicos (triángulos) y valores extremos (asteriscos).

En equinos las vocalizaciones de potrillos separados de sus madres, o de garañones separados de su grupo, se clasifican como llamadas afiliativas de eustrés, especialmente si hay reunión después de la vocalización (Pond *et al.*, 2010; Alberghina *et al.*, 2014). Houpt (2002) observó la reacción de yeguas pony ante la separación de sus potros hasta las 9 semanas y encontró que las vocalizaciones de ambos —madre y potrillo— aumentaban de la semana 1 a 2 y luego disminuían con la edad del potro. Nuestros resultados así lo muestran, las madres vocalizan menos en la medida que los potrillos se acercan a la edad de destete.

Las cargas exactas obtenidas de las variables se muestran en el **Cuadro 5**.

**Cuadro 5. Contribución de las variables con valores-Eigen > 0.7 (en negritas).**

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>
Frecuencia de vocalizaciones	<b>0.712</b>	0.392
Duración de edo. de alerta	<b>0.757</b>	0.192
Cambios en LF/HF	0.119	<b>-0.913</b>
Cambios en SDRR	<b>-0.846</b>	0.190
Cambios en el prom. RR	<b>-0.792</b>	0.069
Calificación HGS	0.583	-0.172
Varianza explicada	2.78	1.09

## 7. CONCLUSIONES

La respuesta observable de las yeguas al estrés por la separación de su cría, disminuye conforme aumenta la edad del potro, suponemos que esto se debe a que los potros se acercan a su destete natural por lo que la madre y el potro disminuyen su vínculo para poder seguir su rutina en el caso de las yeguas, y el aprendizaje y nuevas experiencias en el caso de los potros.

En conjunto, los análisis de la VFC y las conductas potencialmente indeseadas en las yeguas que muestran niveles de ansiedad, indican un estrés moderado transitorio ante la separación transitoria de los potrillos, lo que sugiere que las yeguas están siendo resilientes al proceso de destete y a una completa separación de sus crías.

La exposición de la esclerótica del ojo en animales sometidos a estrés, merece más investigación, ya que en el futuro se podría emplear como un indicador conductual de distrés por separación.

## REFERENCIAS

- Akselrod S. 1995. Components of heart rate variability: basic studies. En: Malik M, Camm AJ. (eds.). *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publ. Comp., Inc. pp. 147-163. [Citado por von Borell *et al.*, 2007].
- Alberghina D, Caudullo E, Bandi N, Panzera M. 2014. A comparative analysis of the acoustic structure of separation calls of Mongolian wild horses (*Equus ferus przewalskii*) and domestic horses (*Equus caballus*). *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.*, 9(5): 254-257.
- Anil L, Anil SS, Deen J. 2005. Pain detection and amelioration in animals on the farm: issues and options. *J. Appl. Anim. Welf.*, 8: 261-278.
- Apter RC, Householder DD. 1996. Weaning and weaning management of foals: a review and some recommendations. *J. Equine Vet. Sci.*, 16: 428-435.
- Arch TE. 2012. Valoración del estrés a través del análisis del llanto. *4ta Jornada de Estrés Animal*. México, D.F. pp. 113-121.
- Arnold, GW. 1985. Parturient behaviour. En: AF Fraser (ed.), *Ethology of Farm Animals*. Elsevier, Amsterdam.
- Ashley FH, Waterman-Pearson AE, Whay HR. 2005. Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: application to clinical practice and future studies. *Equine Vet. J.*, 37: 565-575.
- AWIN. 2015. *AWIN Welfare Assessment Protocol for Horses*. 80 pp. DOI: 10.13130/AWIN\_HORSES\_2015
- Barber JA, Crowell-Davis SL. 1994. Maternal behavior of Belgian (*Equus caballus*) mares. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 41(3): 161-189. [Citados por Rogers *et al.*, 2012].
- Blake HN. 1975. *Talking with Horses*. Trafalgar Square Pub., North Pomfret, VT, pp. 44-46.
- Broom DM, Johnson KG. 1993. *Stress and Animal Welfare*. NY: Chapman & Hall. pp. 57-65.
- Budd, J. 1996. *Reading the Horse's Mind*. Ringpressbooks Ltd. Lydney, Gloucestershire, UK.
- Capdevila L, Niñerola J. 2006. Evaluación psicológica en deportistas. En: E. Garcés (ed.). *Deporte y Psicología*. Murcia, pp. 145-176.



- Carson K, Wood-Gush DGM. 1983. Equine behaviour: I. A review of the literature on social and dam-foal behaviour. *Appl. Anim. Ethol.*, 10(3): 165-178. [Citados por Rogers *et al.*, 2012].
- Cerutti S, Bianchi AM, Mainardi LT. 1995. Spectral analysis of the heart rate variability signal. In: Malik M, Camm AJ, (eds.). *Heart Rate Variability*. Armonk, N.Y.: Futura Publ. Comp., Inc., pp. 63-74. [Citados por von Borell *et al.*, 2007].
- Cirulli F, Terranova ML, Laviola G. 1996. Affiliation in periadolescent rats: behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar or unfamiliar partners. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54(1): 99-105. [Citados por Newberry y Swanson, 2008].
- Clark JM, 2008. Does distress matter? *Alt. Anim. Test. Exper.*, 14: 93-95.
- Crowell-Davis SL. 1994. Daytime rest behavior of the Welsh pony (*Equus caballus*) mare and foal. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 40(3): 197-210.
- Clément F, Barrey É. 1995. Fluctuations de la fréquence cardiaque chez le cheval au repos: (2) facteurs de variation biologiques liés au profil comportemental. Heart rate fluctuations in horse at rest: biological factors of variation related to behavioural patterns. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences, Séries III 318, 867-872.
- Dalla Costa E, Minero M, Lebelt D, Stucke D, Canali E, Leach MC. 2014. Development of the horse grimace scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. *PLoS ONE*, 9(3): e92281.
- Dalla Costa E, Bracci D, Dai F, Lebelt D, Minero M. 2017. Do different emotional states affect the horse grimace scale score? A pilot study. *J. Equine Vet. Sci.*, 54: 114-17.
- Davies Morel MCG. 2003. Weaning and management of youngstock In: Davies Morel (ed). *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. Second Edition, Biddles Ltd. King's Lynn, UK, pp. 235-240.
- de Camargo B, 2007. Estrés síndrome general de adaptación o reacción general de alarma. *Rev. Méd. Cient.*, 17(2): 78-86.
- Dyson S, Berger J, Ellis AD, Mullard J. 2018. Development of an ethogram for a pain scoring system in ridden horses and its application to determine the presence of musculoskeletal pain. *J. Vet. Behav.*, 23: 47-57.

- Donaldson TM, Newberry RC, Špinka M, Cloutier S. 2002. Effects of early play experience on play behaviour of piglets after weaning. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 79(3): 221-231. [Citados por Newberry y Swanson, 2008].
- Duncan P, Harvey PH, Wells SM. 1984. On lactation and associated behavior in a natural herd of horses. *Anim. Behav.*, 32: 255-263.
- Erber R, Wulf M, Becker-Birck M, Kaps S, Aurich JE, Möstl E, Aurich C. 2012a. Physiological and behavioural responses of young horses to hot iron branding and microchip implantation. *Vet. J.*, 191: 171-175.
- Erber R, Wulf M, Rose-Meierhöfer S, Becker-Birck M, Möstl E, Aurich J, Hoffmann G, Aurich C. 2012b. Behavioral and physiological responses of young horses to different weaning protocols: a pilot study. *Stress*, 15: 184-194.
- Erber R, Wulf M, Aurich J, Rose-Meierhöfer S, Hoffmann G, von Lewinski M, Möstl E, Aurich C. 2013. Stress response of three-year-old horse mares to changes in husbandry system during initial equestrian training. *J. Equine Vet. Sci.*, 33: 1088-1094.
- Estep DQ, Crowell-Davis SL, Earl-Costello SA, Beatey SA. 1993. Changes in the social behaviour of drafthorse (*Equus caballus*) mares coincident with foaling. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 35(3): 199-213.
- Feist JD, McCullough DR. 1976. Behavior patterns and communication in feral horses. *Zeitschrift für Tierpsychol.*, 41(4): 337-371. [Citados por Yeon, 2012].
- Fraser AF. 1985. *Ethology of Farm Animals: A Comprehensive Study of the Behavioural Features of the Common Farm Animals*. Elsevier Science Pub., Amsterdam, Netherlands.
- French JM, 1990. Mare-foal relationships in donkeys. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 26(3): 299-300.
- Gaydou L, Bertuzzi R, Moretti E. 2009. La sepsis como estresor: asociación con los niveles séricos de cortisol, proteína C reactiva e interleuquina 1B. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 43(3): 299-305.
- Gill EL. 1988. Factors affecting body condition of New Forest ponies. PhD. Thesis. Department of Biology, University of Southampton. United Kingdom. [Citado por Waran *et al.*, 2008].
- Gonzalo S, Badaraco JJ, Postan GD. 1992. *Audiología Práctica*. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. [Citados por Arch, 2012].

- Grandin, T., 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.*, 75: 249-257.
- Grunau RV, Craig KD. 1987. Pain expression in neonates: facial action and cry. *Pain*, 28(3): 395-410. [Citados por Dalla-Costa *et al.*, 2014].
- Hainsworth R. 1995. The control and physiological importance of heart rate. En: Malik M, Camm AJ, (eds.). *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publ. Comp. Inc. pp. 3-19. [Citados por von Borell *et al.*, 2007].
- Hall C, Kay R, Yarnell K. 2014. Assessing ridden horse behavior: Professional judgment and physiological measures. *J. Vet. Behav.*, 9: 22-29.
- Heffner RS, Heffner HE. 1983. The hearing ability of horses. *Equine Pract.*, 5: 27-32.
- Heleski CR, Shelle AC, Nielsen BD, Zanella AJ. 2002. Influence of housing on weanling horse behavior and subsequent welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 78: 291-302.
- Henry S, Richard-Yris MA, Hausberger M. 2006. Influence of various early human-foal interferences on subsequent human-foal relationship. *Dev. Psychobiol.*, 48(8): 712-718.
- Hoffman RM, Kronfeld DS, Holland JL, Greiwe-Crandell KM. 1995. Preweaning diet and stall weaning method influences on stress response in foals. *J. Anim. Sci.*, 73: 2922-2930. [Citados por Moons *et al.*, 2005].
- Hofmann SG, Moscovitch DA, Litz BT, Kim HJ, Davis LL, Pizzagalli DA. 2005. The worried mind: autonomic and prefrontal activation during worrying. *Emotion*, 5(4): 464.
- Haupt KA. 2002. Formation and dissolution of the mare-foal bond. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 78(2): 319-328.
- Haupt KA, Hintz HF, Butler WR. 1984. A preliminary study of two methods of weaning foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 12: 177-181. [Citados por Moons *et al.*, 2005].
- Haupt KA, Eggleston A, Kunkle K, Haupt TR. 2000. Effect of water restriction on equine behaviour and physiology. *Equine Vet. J.*, 32: 341-44.
- Huff, AN. 1988. Applied horse psychology. *J. Equine Vet. Sci.*, 8: 182-185.

- Intervet. 2007. Reproducción equina. En: *Compendium de Reproducción Animal*. 3ra ed. Sinervia Uruguay/Paraguay. pp. 129-167.
- Kaiser L, Heleski CR, Siegford J, Smith KA. 2006. Stress-related behaviors among horses used in a therapeutic riding program. *JAVMA*, 228: 39-45.
- Khalil AM, Kaseda Y. 1997. Behavioral patterns and proximate reason of young male separation in Misaki feral horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 54: 281-289.
- Kleiger RE, Stein PK, Bosner MS, Rottman JN. 1995. Time domain measurements of heart rate variability. En: Malik M & Camm AJ (eds.). *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publ. Comp., Inc. pp. 33-45. [Citados por von Borell *et al.*, 2007].
- Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 2002. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol. Bull.*, 128: 961-977.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. 1997. The temporal dynamics of the stress response. *Neuros. Biobehav. Rev.*, 21(6): 775-782. [Citados por Newberry y Swanson, 2008].
- Kumate RJ, Hernández OF, Fabila AS. 1994. *Medicina de la Comunicación Humana*. Instituto Nacional de la Comunicación Humana. México. [Citados por Arch, 2012].
- Kuwahara M, Hiraga A, Kai M, Tsubone H, Sugano S. 1999. Influence of training on autonomic nervous function in horses: evaluation by power spectral analysis of heart rate variability. *Equine Vet. J.*, 31: 178-180.
- Lay D, Wilson M. 2001. Physiological indicators of stress in domestic livestock. *Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being*, Indiana. pp. 1-25. [Citados por Orozco, 2013].
- Malinowski K, Hallquist NA, Helyar L, Sherman AR, Scanes CG. 1990. Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol and cell-mediated immune response. *J. Equine Vet. Sci.*, 10(5): 363-368.
- McCall CA, Potter GD, Kreider JL, Jenkins WL. 1987. Physiological responses in foals weaned by abrupt or gradual methods. *J. Equine Vet. Sci.*, 7: 368-374.
- McCall CA, Potter GD, Kreider JL. 1985. Locomotor, vocal and other behavioral responses to varying methods of weaning foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 14: 27e35.

- McDonnell S. 2003. *A Practical Field Guide to Horse Behavior: in the Equid Ethogram*. Lexington, Ky: The Blood-Horse Inc., 375 pp. [Citado por Kaiser *et al.*, 2006].
- McDonnell SM, Haviland JCS 1995. Agonistic ethogram of the equid bachelor band. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 43(3): 147-188.
- McGee S, Smith HV 2004. Accompanying pre-weaned thoroughbred (*Equus caballus*) foals while separated from the mare during covering reduces behavioural signs of distress exhibited. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 88: 137-147.
- McGrath N, Walker J, Nilsson D, Phillips C. 2013. Public attitudes towards grief in animals. *Anim. Welf.*, 22: 33-47.
- McGreevy P. 2004. *Equine Behavior: A Guide for Veterinarians and Equine Scientists*. WB Saunders, Edinburgh, Scotland.
- Mellor, D. 2016. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”. *Animals*, 6(3): 1-20.
- Mellor DJ, Cook CJ, Stafford KJ. 2000. Quantifying some responses to pain as a stressor. En: Moberg, GP & JA Mench (eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Pub., Oxon, UK. [Citados por Tadich, 2011].
- Migliaro E, Canetti, R, Contreras P, Hakas M, Eirea G, Machado A. 2004. Procesamiento de señales para el estudio de la variabilidad de la frecuencia cardiaca. RL Armentano *et al.* *Procesamiento de Señales e Imágenes: Teoría y Aplicaciones*, Buenos Aires: 189-204.
- Mills D. 2005. En: Mills, DS, McDonnell SM. (Eds.). Repetitive movement problems in the Horse, *The Domestic Horse, the Origins, Development and Management of its Behaviour*. Cambridge University Press, pp. 212-227.
- Moberg GP. 2000. Biological responses to stress: Implications for animal welfare. En: Moberg, GP & JA Mench (eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Pub., Oxon, UK.
- Monard AM, Duncan P, Boy V. 1996. The proximate mechanisms of natal dispersal in female horses. *Behav.*, 133: 1095-1124.
- Moons CPH, Laughlin K, Zanella AJ. 2005. Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 91(3): 321-335.

- Morones SME. 2013. Impronta y periodo crítico de aprendizaje. *Memorias del Curso de Etología y Bienestar Animal*. México, DF, 17, 18 y 19 de junio de 2013. pp. 1-3.
- Moss AJ. 1995. Preface. En: Malik M, Camm AJ, (eds.). *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publ. Comp., Inc. pp. iii-iv. [Citado por von Borell *et al.*, 2007].
- National Health and Medical Research Council. 2004. *Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*. 7th ed. NHMRC: Canberra, Australia.
- Newberry RC, Swanson JC. 2008. Implications of breaking mother-young social bonds. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 110(1): 3-23.
- Orozco GH. 2013. Bienestar animal y la fisiopatología del estrés. *Memorias del 6to. Curso de Bienestar Animal y Calidad de la Carne*. Jilotepec CEIEPP-FMVZ-UNAM. pp. 12-18.
- Panksepp J, Watt D. 2011. Why does depression hurt? Ancestral primary-process separation-distress (panic/grief) and diminished brain reward (seeking) processes in the genesis of depressive affect. *Psychiatry*, 74: 5-13.
- Panksepp J. 2003. Feeling the pain of social loss. *Science*, 302(5643): 237-239.
- Parelli P. 1993. *Natural Horse-Man-Ship*. Parelli, P. (Ed.) Western Horseman, Colorado Springs (reprint).
- Plotsky PM. 2000. Intrinsic and extrinsic factors modulating physiological coping systems during development. En: Broom, DM. (ed.), *Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans*. Dahlem University Press, Berlin.
- Ponce J, Álvarez A, Pascual F, Rodríguez LP. 1998. Efectos del ejercicio dinámico máximo sobre electrocardiograma. *Revista Motricidad.*, 4: 45:58. [Citados por Orozco, 2013].
- Pond RL, Darre MJ, Scheifele PM, Browning DG. 2010. Characterization of equine vocalization. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.*, 5(1): 7-12.
- Pumprla J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J. 2002. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *Intern. J. Cardiol.*, 84: 1-14.

- Raynaert R, de Paepe M, Peeters G. 1976. Influence of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acids in cattle. *Horm. Metab. Res.*, 8:109-114. [Citados por Schimdt *et al.*, 2010].
- Rietmann TR, Stauffacher M, Bernasconi P, Auer JA, Weishaupt MA. 2004a. The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis. *J. Vet. Med.*, 51: 218-225.
- Rietmann TR, Stuart AEA, Bernasconi P, Stauffacher M, Auer JA, Weishaupt MA. 2004b. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 88: 121-136.
- Roberts M. 2002. *From My Hands to Yours: Lessons from a Lifetime of Training Championship Horses*. Monty and Pat Roberts Inc., Solvang, CA.
- Rodas G, Pedret C, Ramos J, Ortís LC. 2008. Variabilidad de la frecuencia cardíaca: concepto, medidas y relación con aspectos clínicos (I). Archivos de medicina del deporte. *Revista de la Federación Española de Medicina del Deporte y de la Confederación Iberoamericana de Medicina del Deporte*, (123): 41-48.
- Rogers CW, Walsh V, Gee EK, Firth C. 2012. A preliminary investigation of the use of a foal image to reduce mare stress during mare-foal separation. *J. Vet. Behav.*, 7: 49-54.
- Romero P, Marlyn H, Uribe VLF, Sánchez VJA. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud*, 10(1): 71-87.
- Ropiha, R.T., Mathews, G., Butterfield, R.M. 1969. The duration of pregnancy in Thoroughbred mares. *Vet. Rec.*, 84: 552-555. [Citados por Waran *et al.*, 2008].
- Sandem AI, Braastad BO, Bøe KE. 2002. Eye white may indicate emotional state on a frustration-contentedness axis in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 79: 1-10.
- Sandem AI, Braastad BO. 2005. Effects of cow-calf separation on visible eye white and behaviour in dairy cows: A brief report. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 95: 233-9.

- Schmidt A, Aurich J, Möstl E, Müller J, Aurich C. 2010a. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of three-year-old sport horses. *Horm. Behav.*, 58: 628-636.
- Schmidt A, Hödl S, Möstl E, Aurich J, Müller J, Aurich C. 2010b. Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naive horses during repeated roads transport. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 39: 205-213.
- Schönbom H, Kassens A, Hopster-Jverssen C, Klewitz J, Piechotta M, Martinsson G, Kißler A, burger A, Sierne H. 2015. Influence of transrectal and transabdominal ultrasound examination on salivary cortisol, heart rate, and heart rate variability in mares. *Theriogenology*, 83: 749-758.
- Selye H. 1973. The evolution of the stress concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *Am. Scient.*, 61(6): 692-699. [Citado por Tadich, 2011].
- Shorter Oxford English Dictionary. 1973. 3th ed., Oxford University Press, Oxford, UK.
- Simpson BS. 2002. Neonatal foal handling. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 78(2): 303-317.
- Smiet E, van Dierendonck MC, Sleutjens J, Menheere PPCA, van Brenda E, de Boer D, Back W, Wijnberg ID, van der Kolk JH. 2014. Effect of different head and neck positions on behaviour, heart rate variability and cortisol levels in longed Royal Dutch Sport Horses. *Vet J.*, 202: 26-32.
- Solomon Coder 2017. Copyright © 2017 by András Péter, E-Mail: info@solomoncoder.com
- Søndergaard E, Jago J. 2010. The effect of early handling of foals on their reaction to handling, humans and novelty, and the foal–mare relationship. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 123(3): 93-100.
- Stott GH. 1981. What is animal stress and how is it measured. *J. Anim. Sci.*, 52: 150-153.
- Stucke D, Ruse MG, Lebert D. 2015. Measuring hear rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity: Pros and cons of different methods. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 166: 1-10.
- Sylvia E, Stogryn M, Schittenhelm J, Bartokowski S, Merkies K. 2014. Preliminary demonstrating decreased eye blink rates in horses response to induced



stressors. *Conf. Proc. 10<sup>th</sup> International Equitation Science Conference*. 6-9 Aug. Denmark, Aarhus University. p. 65.

Tadich, N. 2011. Bienestar animal en bovinos lecheros. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 24(3): 293-300.

Tyler SJ. 1972. The behaviour and social organisation of New Forest ponies. *Anim. Behav. Monogr.*, 5: 85-196. [Citado por Waran *et al.*, 2008].

Visser EK, van Reenen CG, Rungren M, Zetterqvist M, Morgan K, Blokhuis HJ. 2003. Responses of horses in behavioral tests correlate with temperament assessed by riders. *Equine Vet. J.*, 35: 176-183.

von Borell E, Langbein J, Despres G, Hansen S, Leterrier C, Marchand-Forde J, Marchand-Forde R, Minero M, Mohr E, Prunier A, Valance D, Veissier I. 2007. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals: A review. *Physiol. Behav.*, 92: 293-316.

von Borstel U, Duncan I, Shoveller A, Merckies K, Keeling L, Millman S. 2009. Impact of riding in a coercively obtained Rollkur posture on welfare and fear of performance horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 116: 228-236.

Waran NK, Clarke N, Farnworth M. 2008. The effects of weaning on the domestic horse (*Equus caballus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 110(1): 42-57.

Waring GH. 2003. *Horse Behavior*. Norwich, NY. pp. 283-300.

Watts JM, Stookey JM, 2000. Vocal behaviour in cattle: the animal's commentary on its biological processes and welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 67: 15-33.

Weary DM, Appleby MC, Fraser D. 1999. Responses of piglets to early separation from the sow. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 63: 289-300.

Weeks J. 1996. Equine agitation behaviours. *Equine Pract.*, 18: 23-24.

Wesley A, Alonso M, Finn E. 1998. *Física*. Pearson. [Citados por Arch, 2012].

Wilson HJ. 2013. Reconocimiento temprano de problemas y reducción de riesgos durante el parto. *Memorias 2do Curso Internacional de Neonatología Equina*. FMVZ-UNAM. pp. 42-47.

Wathan J, Burrows AM, Waller BM, McComb K. 2015. EquiFACS: the equine facial action coding system. *PLoS One*, 10: e0131738.

- Wolff A, Hausberger M, Le Scolan N. 1997. Experimental tests to assess emotionality in horses. *Behav. Process.*, 40: 209-221.
- Wolski TR, Houpt KA, Aronson R. 1980. Role of the senses in mare-foal recognition. *Appl. Anim. Ethol.*, 6: 121-138. [Citados por Rogers *et al.*, 2012].
- Wulf M, Beythien E, Ille N, Aurich J, Aurich C. 2018. The stress response of 6-month-old horses to abrupt weaning is influenced by their sex. *J. Vet. Behav.*, 23: 19-24.
- Yeon SC. 2012. Acoustic communication in the domestic horse (*Equus caballus*). *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.*, 7(3): 179-185.
- Young T, Creighton E, Smith T, Hosie C. 2012. A novel scale of behavioural indicators of stress for use with domestic horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 140: 33-43.