



UNIVERSIDAD NACIONAL AUT. NOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ONTOGENIA DE LAS DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN EL  
TEMPERAMENTO DEL CABALLO DOMÉSTICO (*Equus caballus*):  
INDICADORES CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICOS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

LUCÍA PÉREZ MANRIQUE

TUTOR PRINCIPAL.

ROBYN E. HUDSON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR.

DRA. MARÍA LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DR. FRANCISCO AURELIO GALINDO MALDONADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, DICIEMBRE DE 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos académicos**

Agradezco a mi tutora la Dra. Robyn Hudson por sus consejos y guía durante esta investigación, así como a todos mis compañeros y profesores del Laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, incluyendo también la valiosa ayuda de Carolina Rojas Castañeda por su apoyo técnico.

Gracias infinitas al Dr. Péter Szenczi así como a la Dra. Oxána Bánszegi por su ayuda, apoyo, guía y paciencia.

Especiales gracias al Dr. Manuel Eduardo Morones Soto y a todos los MVZs de la Unidad de Policía Metropolitana Montada quienes diariamente se esfuerzan para mantener el bienestar de tantos caballos con esmero, profesionalismo y mucho amor. Gracias mil por abrirnos las puertas para hacer proyectos de investigación desinteresadamente.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número de registro 227352 para la realización de los estudios de doctorado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN213120 por el apoyo para este proyecto.

Gracias al Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, sobre todo a la Dra. Anne Sisto, Dr. Francisco Galindo y Dr. Carlos Gonzalez durante la realización de este proyecto; al personal del consultorio de Etología Clínica por su apoyo y paciencia, sobre todo al Dr. Alberto Tejeda.

## **Dedicatorias**

En especial, dedico este trabajo a mi familia: a mi Gral. Pérez Toledo, mi gran ejemplo de vida, constancia y persistencia por todo su apoyo. Gracias por ayudarme siempre a descansar y nunca desistir. A mi mami: gracias por tu humor, por tu apoyo, consejos y tolerar mis locuras.

A mis tías Maru y Lucha por ser mis segundas mamás y por tanto amor.

A todos los compañeros de aventura del Laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Andrea Urrutia, Sandra Byer, Santiago García, Elisa Jacinto, Daniel González, Jimena Chacha, Marcos Rosetti. Muy en especial a mis compadres Péter Szenczi y Oxána Bánszegi por su amistad; espero este sea el inicio de muchas publicaciones juntos.

A Aide Gómez, Adriana García, al Dr. Morones, la Dra. Karen Lara, el Dr. Zenteno, el Dr. Vega y Samuel Morones por su apoyo moral, físico, disposición y amistad sin el cual este proyecto no hubiera sido posible.

A mis amigos de la vida: Rebeca Camacho, Alvaro Pedrero, Claudia Hernández, Ruben Alamina, Luisi Baigts, Mayra García y Minerva del Niño por ser un ejemplo de vida. Gracias a la familia Manassero por sus porras, cariño y apoyo. Gracias a la banda de perros: Iraís, Pedro, Ernesto, Paty, María, Dwight y Ere por sus terapias y risas. A Gaby López, Lili Ramírez, Myriam Boeta y sobre todo a Juan García por hacerme reír tanto, acompañarme a la distancia y motivarme con ese viaje al norte tras culminar la chin... tesis. Gracias a mis ejemplos de fortaleza, persistencia y éxito: Alfonso, Karin y Sebastián Aguilar; Dr. Rodríguez Monterde, Dra. Houpt, Dr. Paul McGreevy.

## **Resumen**

El estudio de diferencias individuales en comportamiento y fisiología ha sido de especial interés para varios campos de la ciencia, trayendo nuevas perspectivas y preguntas, entre ellas qué tan pronto pueden ser detectadas, por cuánto tiempo se mantienen o cuándo cambian durante la vida del individuo. El objetivo de la presente investigación fue buscar diferencias individuales consistentes en el comportamiento y fisiología (variabilidad de frecuencia cardiaca) de caballos domésticos jóvenes en etapa pre-destete y post-destete, ver si existía alguna relación entre ambos parámetros y hasta cuándo durante el primer año de edad. Para este fin, 30 potros raza Azteca fueron sometidos a breves separaciones maternas en cuatro ocasiones desde los 10 días de edad hasta los 6 meses de edad, previo a ser destetados (primer artículo publicado). Una vez adaptados a un nuevo medio social y habiendo formado grupos estables con otros potros tras el destete, los mismos animales se sometieron a pruebas de separación social a los 9 y 12 meses de edad (segundo artículo, en revisión). Los resultados de esta investigación son los primeros en demostrar la existencia de diferencias individuales consistentes en parámetros conductuales (vocalización, posición de la cola, locomoción), fisiológicos (intervalo R-R, STDRR, RMSSD) y su correlación en el caballo doméstico desde etapas tempranas del desarrollo (P1-P4); esto, a través de una prueba de temperamento de fácil ejecución con alta relevancia ecológica para la especie. Los resultados destacan la importancia de la selección de variables y contextos relevantes para otras especies con las que se quiera trabajar. Para el periodo post-destete, (P5-P6) encontramos también diferencias individuales en variables conductuales y fisiológicas correspondientes a la etapa pre-destete, pero no más correlación entre ambos parámetros. Estos hallazgos contribuyen al diseño de pruebas de temperamento para selección temprana de individuos para diferentes fines zootécnicos, contribuyendo al bienestar de los animales y del humano, así como de su economía; igualmente,

aportan información relevante al estudio ontogénico de las diferencias individuales en animales, habiendo demostrado su existencia y posible medición al usar pruebas biológicamente relevantes para la especie, desde etapas tempranas de la vida.

**Palabras clave:** Diferencias individuales, temperamento, desarrollo, *Equus caballus*, separacion materna, separacion social, conducta, variabilidad de frecuencia cardiaca.

## **Abstract**

The study of individual differences in behavior and physiology has gained interest in different scientific fields, generating new perspectives and questions including: how early in life can such differences be detected, how long do they last, or when do they change during development? The aim of the present study was to look for the existence of consistent individual differences in the behavior and physiology (heart rate variability) of the domestic horse from a young age during the pre-weaning and post-weaning periods, to look for the existence of any relation between the two parameters, and how long such differences last. We tested 30 Azteca breed foals during brief maternal separation in four repetitions from the 10<sup>th</sup> day of age until the 6<sup>th</sup> month of age, before weaning (first published paper). Once adapted to their new social environment and with social stability, the same foals were given two social separation tests during their 9<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month of age (second paper, in revision). The results of this research are the first to provide evidence for consistent individual differences in behavioral (vocalization, tail raised and locomotion) and physiological (R-R interval, STDRR, RMSSD) measures and their correlation in the domestic horse from an early developmental age (P1-P4) using an easily implemented and ecologically relevant test of temperament possibly applicable to other species also.. For the post-weaning period (P5-P6) the results showed individual differences for the behavioral and physiological parameters, but no correlation between them. The results of this research contribute to the design of temperament tests for the early selection of horses for different applied contexts, improving their welfare as well as human safety and economy. They also contribute with information relevant to the developmental study of individual differences in animals, demonstrating their existence from an early age by using biologically relevant tests.

**Key words:** Individual differences, temperament, development, *Equus caballus*, maternal separation, social separation, behavior, heart rate variability.



## Indice

	Página	
1	Introducción	
	1.1 ¿Por qué estudiar diferencias individuales en el comportamiento de animales?	1
	1.2 Terminología y metodología relacionada a diferencias individuales en el comportamiento de animales.	4
2	Antecedentes	
	2.1 El caballo doméstico ( <i>Equus caballus</i> ) como sujeto de estudio	10
	2.2 ¿Qué sabemos de las diferencias individuales en la conducta del caballo doméstico hasta hoy?	14
3	Objetivo	32
4	Hipótesis	32
5	Presentación de estudios realizados	
	5.1 Animales	33
	5.2 Pruebas experimentales	34
6	Primer artículo publicado: Diferencias individuales en el comportamiento y en la variabilidad de frecuencia cardíaca a lo largo del periodo pre-destete en el caballo doméstico en respuesta a un estresor ecológicamente relevante.	38
7	Segundo artículo, en revisión: Diferencias individuales en comportamiento y fisiología de caballos juveniles desde edad temprana	52
8	Discusión general y conclusiones	58
9	Literatura citada	61

		Página
Lista de Cuadros		
Cuadro 1.	Mediciones conductuales	36
Cuadro 2.	Mediciones de variabilidad de frecuencia cardiaca (VaFc)	37
Lista de Figuras		
Figura 1.	Ejemplares raza Azteca de la UPM-Montada CDMX	34
Figura 2.	Figura 2. a) Edades de cada prueba de separación materna (P1-P4) y separación social (P5 y P6). El destete se llevó a cabo a los 6 meses de edad. b) Representa las etapas y tiempos de cada una de las pruebas realizadas.	35

## **1. Introducción**

### ***1.1 ¿Por qué estudiar diferencias individuales en el comportamiento de animales?***

Recientemente ha incrementado el interés en el estudio de las diferencias individuales en animales en los fenotipos conductuales a lo largo del tiempo y en diferentes contextos, conocido como temperamento o personalidad. Para cualquier persona que haya interactuado con animales, las diferencias conductuales persistentes en el tiempo entre individuos es obvia; sin embargo, estas diferencias eran antes consideradas como ruido y no ameritaban mayor atención científica (Dingemans et al., 2010; Groothuis y Trillmich, 2011; Wolf y Weissing, 2012). Actualmente se ha demostrado y aceptado científicamente que las diferencias y consistencias individuales conductuales relativamente estables a lo largo del tiempo, se presentan en diversas poblaciones y especies animales (revisiones en insectos y arañas: Holbrook et al. (2014); Kralj-Fišer y Schuett (2014); Müller y Müller (2015); Keiser et al. (2018). En anfibios: Kelleher et al. (2018). En aves: Groothuis y Carere (2005); van Oers y Naguib (2013). En mamíferos: Hayes y Jenkins (1997); Gartner y Weiss (2013); Finkemeier et al. (2018), por lo cual deben de tener alguna función y ser sujeto de estudio.

El estudio científico de las diferencias individuales en animales es multidisciplinaria, por ejemplo, en conservación se ha aplicado en la crianza de especies en situaciones de cautiverio, selección de animales para reproducción, reintroducción a vida salvaje e introducciones sociales (Powell y Gartner, 2011); en zootecnia para selección de pies de cría y selección de animales con características conductuales y físicas deseables (Tetley y O'Hara, 2012); en bienestar animal para el uso y evaluación de indicadores en animales de producción y mascotas (Grandin, 1998; Manteuffel et al., 2004; Gartner, 2015; Leliveld et al., 2017; Urrutia et al.,

2019; Martínez-Byer et al., 2020); en clínica y salud humana para la detección de tendencias a enfermedades físicas y mentales para lo cual, cabe mencionar, se usan también modelos animales (Koolhaas et al., 1999; Lilienfeld y Penna, 2001; Cavigelli, 2005; Mehta y Gosling, 2008; Boissy y Erhard, 2014; Roberts et al., 2016; Reid et al., 2017). El abordaje que cada disciplina usa para estudiar las diferencias y consistencias fenotípicas de los animales es muy variado, incluso confuso y contradictorio, dando entonces necesidad a la integración teórica y metodológica entre diversos campos de estudio.

Bajo la óptica de biología evolutiva y ecológica, el estudio de las diferencias fenotípicas entre individuos busca comprender los beneficios y relevancia de éstas para la sobrevivencia de las especies, por lo cual, la comparación de dicha variación entre especies es también una forma de estudiar los orígenes y significancia adaptativa de características o rasgos conductuales específicos (Gosling y John, 1999; Gosling, 2001).

El abordaje ontogénico de las diferencias y consistencias individuales es relevante para una mejor comprensión evolutiva e incluso para la comparación de rasgos conductuales entre poblaciones y especies (Gosling, 2008; Gosling y Harley, 2009). Esta perspectiva considera tanto las consistencias conductuales como los cambios que se dan durante la vida de un individuo que, como ya se mencionó pueden o no ser benéficos para la supervivencia individual, pero de cualquier manera forma parte de los procesos de la selección natural (Stamps y Groothuis, 2010a); por ejemplo, los animales jóvenes requieren pasar por procesos adaptativos conductuales, fisiológicos y metabólicos respectivos a los nichos ambientales (físicos y sociales) en los que habitan para sobrevivir y reproducirse en edad adulta. Dichos cambios, pueden o no desaparecer por efecto de la misma edad pero no necesariamente por ser poco adaptativas. Esto significa que los cambios ontogénicos, así como los mecanismos que los

provocan (causas), son también inducidos por necesidades adaptativas y con el tiempo, pueden retomar patrones anteriores en el individuo y ser visibles a través de reorganizaciones conductuales.

El estudio de consistencias individuales durante el desarrollo, involucra investigar procesos complejos de continua interacción entre genes y medio ambiente, por lo tanto, su estudio incorpora cuestiones sobre heredabilidad, estabilidad y cambio. Requiere utilizar diseños experimentales longitudinales que permitan establecer relaciones entre variables, momentos de cambio o permanencia en la conducta, así como comparaciones entre distintas poblaciones demográficas que ayuden a estimar las fuerzas de la selección natural y posible causalidad (Hayes y Jenkins, 1997; Caspi et al., 2005). Particularmente los mecanismos ontogénicos de la personalidad animal han ganado gran interés científico en los últimos años (Stamps y Groothuis, 2010b; Trillmich y Hudson, 2011; Trillmich et al., 2015), sin embargo, en mamíferos que no sean, ni estén en condiciones de laboratorio y la necesidad de una muestra adecuada complican la ejecución de experimentos. En este sentido, los mamíferos domésticos con alta facilidad de feralizarse (ej. gatos y caballos) representan una fuente de información relevante al tema en virtud de que son manejables desde edad temprana, despliegan conductas de fácil identificación y medición bajo situaciones de experimentación con mayor apego a situaciones de vida libre. En gatos domésticos (*Felis silvestris catus*), se han hecho notables hallazgos desde etapas tempranas de vida bajo situaciones naturales o en laboratorio (Hudson et al., 2011; Szenczi et al., 2016; Hudson et al., 2017; González et al., 2018). En caballos domésticos, es muy poca la información que se tiene sobre desarrollo de diferencias individuales, misma que se abordará en la sección 2.1 del presente documento.

## ***1.2 Terminología y metodología relacionada a diferencias individuales en el comportamiento de animales***

El consenso de la existencia de la estabilidad en las diferencias individuales en comportamiento a lo largo del tiempo y contextos en especies diferentes al humano, precedieron al crecimiento en el estudio científico en el tema como una nueva línea de investigación multidisciplinaria, generando diferencias conceptuales y metodológicas. Cada método y abordaje disciplinario ofrecen ventajas, pero también tienen sus limitaciones, por lo cual se considera que el estudio de diferencias individuales en los animales aún está en proceso de cambio y desarrollo. Las diferencias en las definiciones, marcos teóricos y los enfoques metodológicos deben de tomarse en cuenta entre disciplinas para mantener intercambio de información y uso básico y aplicado.

Para la psicología humana el término personalidad describe rasgos mentales distintivos y relativamente estables a lo largo del tiempo que explican la conducta del individuo. Goldberg (1993) describió los rasgos de conducta humana que componen cada dimensión en el “Modelo de los Cinco Factores”, mismo que fue adaptado para el uso de investigaciones en animales (Réale et al., 2007; Réale et al., 2010), pero al trabajar con animales, muchos autores evitaron el término “personalidad animal”, prefiriendo “temperamento” en un intento de evitar antropomorfismos (MacKay y Haskell, 2015; Finkemeier et al., 2018). En psicología humana, el temperamento es un atributo de la personalidad (Buss, 1995; Gosling, 2001), como se explicará más adelante.

“Personalidad animal” tiene dos grandes definiciones: 1) la definición en el sentido amplio, que se refiere a las diferencias consistentes entre individuos existentes en cualquier conducta y que generalmente tienen consecuencias ecológicas (Réale et al., 2010; Roche et al., 2016). Bajo esta definición, “consistencia” significa que las diferencias entre individuos generalmente se

mantienen, aún si los valores de los rasgos cambian, por ejemplo por edad o experiencias de vida (Réale et al., 2007). 2) La segunda definición de personalidad, es más “restringida”, se refiere a las diferencias individuales consistentes en agrupaciones de conductas específicas que suelen medirse en pruebas estandarizadas de situaciones desafiantes y/o novedosas. (ej: pruebas de campo abierto, de objeto novedoso, de aislamiento). Esta estructura metodológica suele usar adaptaciones del modelo humano de los 5 factores en el cual, las conductas medidas son clasificadas o agrupadas en ejes o rasgos conductuales (Réale et al., 2007). Los cinco ejes de personalidad animal propuestos son: agresividad (respuestas agonistas hacia conespecíficos), sociabilidad (respuestas ante la ausencia o presencia de conespecíficos que no sean agonistas), exploración o neofobia (respuestas hacia estímulos o ambientes nuevos), valentía (respuestas ante estímulos o situaciones riesgosas), y actividad (el nivel general de la actividad individual). Este modelo tiene como ventaja la posibilidad de comparar entre estudios y especies, así como permitir buscar relaciones entre rasgos de personalidad y otras variables dentro de la historia de vida que involucren experiencias, aprendizaje o fisiología (Gosling y John, 1999). La desventaja de seguir este modelo, es que no es el más representativo de ninguna especie, por lo que parece estar ya en desuso (Bell, 2017).

Para estimar la repetibilidad de variables conductuales en estudios de personalidad animal bajo la definición del “sentido amplio”, se usan pruebas estadísticas que calculan la proporción de variación en rasgos atribuibles a diferencias individuales, es decir, a la magnitud en la cual los valores de las diferencias individuales se mantienen a lo largo del tiempo (Bell et al., 2009; Stamps y Groothuis, 2010b). El término “consistencia diferencial”, según (Stamps y Groothuis, 2010a; Groothuis y Trillmich, 2011) describe cómo las diferencias conductuales inter-individuales se mantienen a lo largo del tiempo en un solo contexto, lo cual se obtiene también

a través de pruebas de repetibilidad, posteriormente obtiene rasgos de personalidad (Réale et al., 2007), y finalmente se compara la variabilidad inter e intra-individual (Lessells y Boag, 1987; Nakagawa y Schielzeth, 2010); por lo tanto, la consistencia diferencial (repetibilidad), refleja cómo pueden variar conductas particulares en dos o más momentos del desarrollo en el mismo contexto. La personalidad se identifica cuando la repetibilidad conductual se da por una varianza baja intra-individual en relación a la varianza inter-individual de la población (Carlson y Tetzlaff, 2020).

“Estilos de adaptación” es otro término considerado un atributo de la personalidad que se refiere a la correlación en rasgos característicos de adaptación de cada individuo, manteniendo indicadores emocionales como una dimensión aparte (Koolhaas et al., 1999). Los estilos de adaptación se reflejan mediante una diferenciación inter-individual estable en conductas y valores fisiológicos medidos en diversas situaciones estresantes (Koolhaas et al., 2007; Koolhaas, 2008) por lo que se definen como patrones de respuesta alternativa ante a un estresor. El concepto de estilos de adaptación implica que los animales reaccionan con patrones alternativos de respuesta, por ejemplo, en el paradigma de nado forzado de roedores, se considera que un roedor agresivo reaccionaría con un nado más activo que uno no agresivo, que a su vez tendería a dejarse flotar (Veenema et al., 2005). Esto implica que para interpretar estas pruebas, se debe de considerar la presencia y magnitud de las conductas ante un estímulo estresante, así como el tipo de respuesta conductual y probablemente historia de vida (Langenhof y Komdeur, 2018). El estudio de estilos de adaptación y los diferentes estímulos que lo pueden afectar se suele usar para estudios médicos y en animales de laboratorio, donde cada factor analizado puede afectarse por consecuencia de uso de fármacos, genética, desarrollo o fisiología neuroendócrina, entre otros.



En 2004, se introdujo el término “síndrome conductual” (Sih et al., 2004) para denominar al conjunto de comportamientos correlacionados en cada rasgo o dimensión de personalidad. Este término puede aplicarse a cualquier conjunto de comportamientos y/o mediciones fisiológicas correlacionadas entre sí que muestren consistencia interindividual en una o varias situaciones por un tiempo prolongado en la vida del individuo (Sih et al., 2004; Dosmann et al., 2015; Wuerz y Krüger, 2015). Su evaluación incluye la búsqueda de correlaciones fenotípicas entre conductas de individuos en poblaciones determinadas (Garamszegi et al., 2013).

Como ya se mencionó, para la psicología humana, el término “temperamento” está vinculado al de personalidad. Se define como la tendencia conductual persistente a lo largo de la vida del individuo que aparece desde edades tempranas y que, por lo tanto, posee un componente hereditario manifiesto desde etapas infantiles. Se considera al temperamento como la base (Buss, 1995; Gosling, 2001) de la personalidad y que está ligado a procesos psicológicos y biológicos determinantes para la formación de la personalidad del adulto (McCrae et al., 2000; Rothbart et al., 2000).

Algunos autores de diferencias individuales en animales, usan indistintamente el término personalidad y temperamento (Gosling, 2001; Réale et al., 2007). En animales de producción, este término se usa con mayor recurrencia que personalidad, a veces para evitar antropomorfismo, y en virtud también de que los medidores están relacionados tanto a conducta como a medidores fisiológicos reflejados en producción (ej. producción láctea, cárnica, mediciones endócrinas, etc.), que a su vez están ligados a factores hereditarios (MacKay et al., 2013; Meale et al., 2017) . Dentro de la zootecnia, es importante poder determinar productividad, fácil manejo y adaptación al estrés desde etapas tempranas de la vida. El análisis

de los resultados conductuales y/o fisiológicos obtenidos en pruebas de temperamento suelen buscar relaciones entre éstos. Se sabe que entre el 12% a 24% de los accidentes de humanos alrededor del ganado, se da durante el manejo a pesar de contar con instalaciones y darles uso adecuado, por lo cual es altamente deseable identificar animales poco reactivos o excitables desde edades tempranas (Dogan y Demirci, 2012), idealmente también que mantengan niveles productivos altos.

Las pruebas de temperamento para animales de producción suelen ser exposiciones a situaciones que generen conductas indicativas de miedo en pruebas estandarizadas (exposición a objetos o ambientes novedosos, aproximación al humano, pruebas en campo abierto, confrontaciones o separaciones sociales, pruebas de restricción física) (Forkman et al., 2007; Finkemeier et al., 2018) en virtud de que el miedo, además de provocar problemas de manejo al ser crónico (Boissy y Bouissou, 1995; Deesing y Grandin, 2014) puede detrimentar el bienestar y la producción o aspectos de ésta, por ejemplo, conductas maternas, potencial reproductivo, lactancia e inmunosupresión (Boissy y Bouissou, 1995; Rushen et al., 1999b; Boissy et al., 2005; Boissy y Erhard, 2014).

Algunos estudios de temperamento en animales productivos utilizan cinco ejes (audacia, agresividad, neofobia, exploración, sociabilidad), o tres (audacia, exploración, sociabilidad) (Forkman et al., 2007; Toms et al., 2010; Neave et al., 2020). Aunque parece haber un consenso general sobre la definición de cada uno de estos ejes, cada investigador es quien determina qué conductas y/o parámetros fisiológicos incluye dentro de cada uno, haciendo su clasificación intuitiva, consecuentemente que los resultados entre investigaciones sean poco comparables y poco consistentes. Otra situación es que las pruebas estandarizadas no siempre son inherentes a la naturaleza de la especie. Respecto al diseño experimental, habrá que considerar que muchas

investigaciones no realizan pruebas de repetibilidad ni son longitudinales (Carter et al., 2013; Beekman y Jordan, 2017; Peralas et al., 2017).

Los estudios de desarrollo en animales de producción o granja suelen enfocarse en la descripción de patrones conductuales en general a nivel poblacional o especie. Pocos buscan la variación conductual a nivel individual pero parece que cada vez adoptan más interés en la evaluación de diferencias individuales: En becerros: Jensen et al. (1999); van Reenen et al. (2004); Neave et al. (2020). En pequeños rumiantes: Price y Thos (1980); Barnard et al. (2015); Nawroth et al. (2017) y en cerdos: Leliveld et al. (2017) en virtud de la alta utilidad en campos aplicados para selección de animales y comparación de sistemas de manejo.

En caballos, existen numerosos estudios sobre diferencias individuales en animales ya adultos con especial interés en selección de temperamentos para determinados fines zootécnicos, sin embargo, existe sólo un estudio publicado con abordaje ontogénico en etapa pre-destete (Lansade et al., 2007). Como ya se mencionó, la selección de variables y diseños experimentales para el estudio de diferencias individuales en mamíferos es un reto fuerte dados los requerimientos de una muestra numerosa, longitudinalidad e idealmente, homogeneidad de manejo fuera de contextos de laboratorio que permitan una mejor aproximación a situaciones naturales y con pruebas biológica y prácticamente relevantes; existe entonces un vacío de información sobre el surgimiento de diferencias individuales en especies grandes y de vida prolongada, por lo cual el caballo es una especie altamente valiosa en este sentido, de lo cual se hablará más a fondo en el punto 2.1.

## 2. Antecedentes

### 2.1 *El caballo doméstico (Equus caballus) como sujeto de estudio*

El caballo ha estado vinculado históricamente con el humano. Se estima que su domesticación se dió entre los años 8000 y 6000 A.C. (Mignon-Grasteau et al., 2005), aunque las evidencias más antiguas de artefactos para su manejo (bocados) datan del tercer milenio A.C. (Levine, 2005). Existen varias definiciones de “domesticación”; para Price (1984) y Mignon-Grasteau et al. (2005), este proceso puede solamente darse en animales que se adaptaron a las condiciones provistas por el humano, lo cual implica la existencia de características intrínsecas del animal, incluyendo la combinación de cambios genéticos a lo largo de generaciones, con adaptaciones al medio ambiente durante el desarrollo de los individuos que recurren en cada generación, y que permiten una adaptación sucesiva (revisiones en: Price (1999); Diamond (2002); Mignon-Grasteau et al. (2005); Jensen (2006); Vigne (2011); Kaiser et al. (2015). Entre los cambios que implica la cercanía con el humano, destaca la adaptación a la dieta, la habilidad para aceptar el confinamiento, mantenimiento o mejora de éxito y velocidad reproductiva, adaptación jerárquica y el no tener conductas agresivas hacia él (Diamond, 2002). No conforme con la flexibilidad y adaptación a condiciones domésticas, el caballo ha sido utilizado para una amplia gama de propósitos: fuente de alimento, transporte, carga, fines bélicos, deportivos y recientemente como animal de compañía y terapia (Hintz, 1995).

En la actualidad y a nivel mundial, aún existen poblaciones de caballos en situaciones ferales y semiferales cuyas observaciones han permitido entender más sobre la especie (Tyler, 1972; Feist y McCullough, 1976; Berger, 1977; Crowell-Davis, 1985; Crowell-Davis et al., 1985; Khalil y Kaseda, 1997; McDonnell, 2003; Nimmo y Miller, 2007), y comparar su comportamiento con caballos en situación de estabulación con historia previa de domesticación

y selección intensiva. Las observaciones de estas poblaciones así como estudios que asocian mecanismos y relaciones de enfermedad y/o mental con sistemas de manejo en cautiverio (Fureix et al., 2010; Whisher et al., 2011; Lesimple et al., 2019; Ruet et al., 2019), han llegado al consenso de que particularmente el caballo posee no solo gran capacidad de adaptabilidad hacia los sistemas de manejo intensivo, sino viceversa también, es decir, que con gran facilidad puede adaptarse a ambientes naturales manifestando patrones conductuales similares (incluso iguales) a sus antecesores salvajes (Feist y McCullough, 1976; Berger, 1977; Khalil y Kaseda, 1997; Nimmo y Miller, 2007). El caballo Konik es el descendiente genético existente más próximo del caballo de Tarpán (*Equus caballus gmelini*) que a su vez, es el antecesor salvaje ya extinto más próximo al caballo doméstico. Se cree que los últimos ejemplares del caballo de Tarpán se cruzaron con el caballo Konik, mismo que sobrevive en vida libre en Polonia ya desde hace varias generaciones. Se han realizado programas de conservación y ha sido utilizado también para comparar el comportamiento de grupos en vida salvaje con caballos domésticos y con caballos también Konik pero mantenidos en sistemas de manejo doméstico. Se ha visto, que guarda características de animales salvajes como mantener vigilia y respuesta de huida súbita o evitación ante cambios en el ambiente, incluyendo al humano (Jeziński et al., 1999; Górecka-Bruzda et al., 2017); sin embargo, se encontró que cuando recibe manejo y entrenamiento cercano a éste, a pesar de su carga genética, el caballo Konik puede “domesticarse” y adaptarse con gran facilidad al manejo humano. Estos hallazgos, pueden también compararse con observaciones con poblaciones de caballos ferales “Mustang” americanos y “Brumbies” australianos (Keiper y Keenan, 1980; Waran y Casey, 2005; Dalke y Hunt, 2017).

Los resultados de observaciones en grupos y bajo sistemas salvajes o semi-ferales han concluido que cualquier caballo feral, está equipado con las características para domesticarse mediante manejo o entrenamiento (Górecka-Bruzda et al., 2017) aunque de forma individual pueden mostrar mayor dificultad en el intento; de manera opuesta, cualquier caballo en situaciones de manejo intensivo muestra características similares a las de sus semejantes en vida libre: es un animal herbívoro, forrajeador, altamente gregario con grupos y dinámicas sociales características y muy bien establecidos (revisión en: Tyler, 1972; Feist y McCullough 1976; Crowell-Davis, 1985; McGreevy, 2004; Søndergaard y Ladewig , 2004; Fureix et al., 2010; Christensen et al., 2011; Hartmann et al., 2012; Ruet et al., 2019), con gran capacidad de comunicación inter e intra específica, con capacidades atléticas que le permiten emprender la huída como principal medio de defensa ante la presencia de posibles amenazas. De igual forma, el desarrollo social de la especie tanto en sistemas intensivos como en animales salvajes o semi-ferales, es igual, razón por la cual estas comparaciones han despertado la alerta sobre las carencias y limitaciones de espacio, movimiento y sobre todo, sociales bajo los que se mantiene a la especie en sistemas de manejo convencional, disminuyendo severamente el nivel de bienestar de la especie.

En etapas tempranas de vida, durante el periodo postnatal, los potros mantienen contacto cercano y estrecho con la madre, estableciendo un vínculo sumamente fuerte que probablemente incluya reconocimiento individual. Este fuerte vínculo, favorece el aprendizaje del potro a través de la respuesta de la madre hacia estímulos ambientales (Christensen et al., 2002). Estudios observacionales longitudinales han concluido que a lo largo del desarrollo del potro, las interacciones con la madre gradualmente van siendo más espaciadas en virtud de que

el potro incrementa conductas de exploración social hacia otros miembros de la manada, exploración hacia el medio ambiente; juego, acicalamiento con congéneres de su edad; locomoción y descanso (Tyler, 1972; Crowell-Davis, 1985; Bánszegi et al., 2017). Se cree que estos patrones ontogénicos hacen que los potros gradualmente pierdan atención en el comportamiento de sus madres y por lo tanto, disminuya la imitación o la influencia sobre su conducta, al mismo tiempo que incrementa la manifestación de otras conductas por contacto con otros estímulos, por lo cual el contacto materno, y social es sumamente importante para la especie (Haupt, 2002; Henry et al., 2007), sobre todo si se considera que se da a la par de otras conductas de mantenimiento (Crowell-Davis, 1985; Crowell-Davis et al., 1985; McDonnell, 2003) que al verse también afectadas (ej. sueño y descanso, alimentación), pueden también alterarse mostrando patologías físicas y/o conductuales, como ya se mencionó.

Considerando que el caballo doméstico ofrece ser una especie sumamente similar a sus congéneres en condiciones libres de vida, a que mantiene características ontogénicas claras y sobre todo gregarias, por lo que se consideró que la separación materna breve en repetidas ocasiones antes del destete, así como la separación social de un grupo ya bien establecido, podría ofrecer hallazgos valiosos al estudio de diferencias individuales, al ser pruebas biológicamente relevantes para esta especie con posible aplicación para optimizar la selección de individuos particulares para programas de cría o fines zootécnicos específicos.

## ***2.2 ¿Qué sabemos de las diferencias individuales en la conducta del caballo doméstico hasta hoy?***

La literatura sobre temperamento y/o bienestar incluye a los caballos dentro de distintos rubros, con diversidad de parámetros medibles y dependiendo de la función zootécnica que éstos desempeñen. A diferencia de los animales de producción o granja, los caballos pueden resultar difíciles de evaluar pues no existe un producto tangible como pudiera ser la producción láctea o cárnica, por ejemplo. El rendimiento atlético, la ausencia de conductas consideradas como anormales así como de enfermedades, la manifestación de conductas normales y algunos indicadores fisiológicos de estrés suelen ser usados para determinar, sobre todo niveles de bienestar en esta especie (Hausberger et al., 2004; Nagy et al., 2010) ; sin embargo, vale la pena considerar que no todos los caballos se mantienen con fines deportivos; se les considera también animales de compañía, de terapia, de trabajo, etc. (ej. en campo, policial) con gran variedad de sistemas de mantenimiento y manejo (Hintz, 1995). El interés también respecto al bienestar de la especie así como la necesidad de encaminar la selección de animales hacia ciertos y muy variados fines zootécnicos ha puesto en marcha el estudio de las diferencias individuales.

Recientemente una encuesta europea reveló que los criadores de razas deportivas de caballos, le dan algo de importancia a los rasgos de personalidad (26%), mientras otros los consideran muy relevantes (74%). El 96% de los encuestados (criadores, jinetes y propietarios), opinan que los caballos de raza deben de ser evaluados para temperamento durante pruebas demostrativas a pesar de que éstas se han criticado por falta de objetividad y universalidad (no sólo por el gremio científico, sino también por criadores y jinetes). El 57% de los criadores encuestados indicaron que hacen uso de algunas guías para evaluar temperamento y seleccionar a sus pies de cría (von Borstel et al., 2013).



En Alemania, los rasgos de personalidad se dividen en “internas” y “externas”. Las primeras se denominan temperamento, carácter, manejabilidad, inteligencia y disposición para el desempeño (Koenen et al., 2004), y las externas se refieren a conformación, salud o características de desempeño deportivo. Dentro de las personas que tienen caballos con interés deportivo sin interés a nivel competitivo ni profesional, se buscan características menos demandantes en cuanto al desempeño, pero si tendientes a ser un animal de compañía, lo cual ha creado problemas pues los animales que salen a la venta son previamente entrenados por profesionales que enfocan el manejo y entrenamiento a fines competitivos y profesionales, siendo muchas veces muy fuerte, rápido y basado en refuerzos negativos o a veces coercivos (Cook, 2003; McGreevy, 2007). El hecho de que estos animales salgan al mercado o se mantengan como pies de cria animales con características deseadas para la competencia, y que ontogénicamente se estén promoviendo manejos sesgados, debe de tener un efecto sobre la manifestación conductual de ciertas razas en individuos adultos, como se ha demostrado ya en distintas especies (Langenhof y Komdeur, 2018). Este sesgo puede explicar los resultados de Lansade et al. (2016), donde encontraron que los caballos que presentan más conductas de miedo son altamente apreciados por jinetes expertos, sobre todo de salto. Esto contrasta con recientes hallazgos de Sackman y Houpt (2019) quienes, mediante un cuestionario realizado a propietarios en Estados Unidos de América, encontraron que no existe asociación entre algún rasgo de personalidad y disciplinas ecuestres, así como entre personalidad nerviosa y presencia de conductas estereotipadas o no deseadas. Para este estudio, se consideraron razas arabs, pura sangre inglés, cuartos de milla, pintos, appaloosas, Tennessee walkers, warmbloods y razas de tiro; de estos, los más nerviosos resultaron los árabes, pura sangre inglés, Tennessee walkers y warmbloods, y los menos nerviosos los cuarto de milla y razas de tiro. El hallazgo, puede

deberse a la fuerte base genética para la selección de pies de cria de las distintas razas (Lloyd et al., 2008; Wallner et al., 2017).

Retomando la relevancia ontogenica en el temperamento, habrá que tomar en cuenta que los distintos entrenamientos tienen también un efecto sobre la personalidad, por lo tanto, si los caballos relativamente jóvenes son sometidos a métodos de mayor demanda atlética y con sesgo hacia fines deportivos competitivos en los criaderos, probablemente sólo los caballos de raza (criadero) que soportan este tipo de manejo tendrán resultados favorables una vez que se realicen las pruebas de temperamento, mismas que no considerean selección en contra de las reacciones negativas durante errores de manejo hacia el humano, una vez que lleguen a ser vendidos con fines recreativos o de compañía y expuestos a éstos.

Con objeto de analizar el estado del arte en la evaluación de características individuales del comportamiento en criaderos alemanes, von Borstel et al. (2013) realizaron un estudio donde encontraron que las evaluaciones hoy existentes, a pesar de ser realizadas por expertos en caballos carece de objetividad y cuyos resultados no son confiables ni coinciden entre evaluadores con más de 10 años de experiencia, lo cual es consistente con otros autores (Mills, 1998; Lloyd et al., 2007), por lo cual sugieren cambios en las estrategias de evaluación y reestablecimiento de guías para el llenado de dichas pruebas de temperamento que incluyan descripciones concretas de conductas y conceptos más claros, así como pruebas conductuales objetivas.

Los parámetros utilizados mayormente en pruebas de temperamento experimentales, son respuestas ante situaciones de estrés. En los pocos de los experimentos científicos, se consideran parámetros fisiológicos. Muchos experimentos realizados en caballos evalúan el

impacto en el bienestar de ciertos manejos durante el desarrollo (ej. entrenamiento, instalaciones, destete) y se describen a nivel poblacional (Moons et al., 2005; Ligout et al., 2008; Visser et al., 2009; Merkies et al., 2016; Lansade et al., 2018) , pero consideran también factores temperamentales en la respuesta de los animales.

El estudio del desarrollo de diferencias individuales requiere tres grandes condiciones: 1) longitudinalidad; 2) una cantidad de sujetos experimentales grande y controlada para edad, sexo y raza; 3) condiciones homogéneas en el medio ambiente físico y social de desarrollo (ej. dieta, manejo, cuidado e interacciones) (Le Scolan et al., 1997; Deesing y Grandin, 2014). En este sentido, el caballo doméstico parece ser una especie poco amigable para estudiar este tópico, a diferencia de los animales de laboratorio o de producción mantenidos en sistemas intensivos.

Dada la gran necesidad de que aún existe por seleccionar caballos para múltiples y diversas actividades, desde finales de los años 90s se comenzaron a publicar varios experimentos cuyo objetivo fue evaluar el temperamento o reactividad del caballo doméstico considerando también cuestiones de seguridad para el humano (Le Scolan et al., 1997; Mackenzie y Thiboutot, 1997; Wolff et al., 1997; Anderson et al., 1999; Jezierski et al., 1999; Thomas et al., 2006; Knubben et al., 2008). El poder predecir y evaluar el temperamento de caballos, sería sumamente útil para seleccionar animales con aptitudes conductuales para ciertos entrenamientos o manejos (ej. caballos adecuados para trabajo policial, equinoterapia versus para carreras); para evaluar dichos entrenamientos o manejos, incluso para aportar información respecto a los mecanismos de desarrollo, o diagnóstico de problemas conductuales y de bienestar, en virtud que algunos individuos pueden adaptarse mejor a ciertas condiciones de manejo y entrenamiento que otros (Seaman et al., 2002).

La mayoría de información científica disponible sobre consistencia de diferencias individuales en caballos se ha hecho con animales jóvenes o adultos probablemente por que el consenso ha sido que las diferencias individuales en algunos mamíferos son poco consistentes en edades tempranas e incrementan en la adultez (En bovinos: Jensen et al. (1999); van Reenen et al. (2004). En canidos: MacDonald (1983); Goddard y Beilharz (1984). En cerdos: Ruis et al. (2000); Janczak et al. (2001), y humanos: revisión en Zuckerman (1991). A nuestro conocimiento solo un estudio específicamente sobre el desarrollo de diferencias individuales que se ha realizado en potros (Lansade et al., 2007). Otro estudio exploró entre el efecto en potros del manejo gentil de sus madres a los 6 meses de edad, revelando que el hecho de que los potros vean a sus madres ser manejadas los vuelve más dóciles alrededor de los humanos, al ser evaluados a los 15, 30 y 35 días posteriores a la exposición humano-yegua, sin embargo, los autores mencionan haber encontrado una gran variación interindividual en las respuestas de los potros, así como estabilidad en las respuestas exploratorias de los potros hacia el experimentador sin que éstas estuvieran correlacionadas con las conductas de la yegua hacia el experimentador, indicando que éstas pueden estar fuertemente influenciadas no por la madre, sino también por características temperamentales del potro (Henry et al., 2007).

Las pruebas estandarizadas que se han utilizado para evaluar el temperamento de caballos, suelen buscar respuestas de miedo mediante exposiciones a sitios (arena) novedosos, objetos novedosos, exposiciones a humanos desconocidos, restricción física y/o respuestas de sorpresa (revisión en Forkman et al., 2007), mismas que se detallan a continuación.

En la prueba de exposición a sitio novedoso, los caballos se conducen a un sitio amplio y desconocido para ellos y se les observa durante 5-20 minutos. Suelen medirse variables como

actividad locomotora (quedarse quieto, caminar, trotar o galopar), conductas de eliminación (defecar u orinar), posiciones corporales (de la cola, del cuello, de orejas) y vocalizaciones. En algunas ocasiones, se prosigue con otras pruebas pasado el tiempo de evaluación a la arena novedosa en esta misma (Le Scolan et al., 1997; Wolff et al., 1997; Seaman et al., 2002; Lansade et al., 2007). De los estudios que han realizado esta prueba en caballos, solo una realizó repeticiones en 33 caballos, habiendo mostrado repetibilidad con 9 días de intervalo entre pruebas, pero la edad de los animales fue sumamente variable (entre 5 y 28 años de edad, Seaman et al., 2002). Las desventajas metodológicas, es la gran variabilidad entre edades, que los caballos fueron valorados solos y probablemente, al ser una especie gregaria, los investigadores hayan evaluado reacciones de miedo, no por el estímulo al que los confrontaron, sino por el aislamiento social. Igualmente, los resultados de las pruebas de exposición a sitio novedoso, a objeto novedoso y a un humano no correspondieron ni fueron consistentes a lo largo de las repeticiones. Tampoco se encontró relación entre las respuestas a las pruebas y la exposición a un estímulo sorpresa ni con la evaluación de temperamento (reactivo versus pasivo) emitida por el personal de la granja.

La exposición a objeto novedoso se ha realizado en caballos de forma independiente o después de haber realizado la prueba de exposición al sitio novedoso (Le Scolan et al., 1997; Wolff et al., 1997; Anderson et al., 1999; Visser et al., 2001; Seaman et al., 2002; Visser et al., 2002; Visser et al., 2003a; Lansade et al., 2007). Los estímulos a los que se exponen los caballos suelen ponerse antes de la llegada del caballo, mismo que pasó previamente por un periodo de habituación a la arena. En caso de que la prueba del objeto novedoso proceda a la de sitio novedoso, se deja pasar un tiempo entre ambas pruebas (hasta 4 minutos) para evitar tener el

efecto de una sobre la otra, o se colocan los objetos novedosos en el techo y tras la habituación a la arena, se dejan caer del techo (Le Scolan et al., 1997; Momozawa et al., 2003). Los objetos usados pueden ser una pelota, un paraguas, un trineo (Le Scolan et al., 1997; Seaman et al., 2002; Momozawa et al., 2003; Visser et al., 2003a). Nuevamente, los estudios que han usado esta prueba han usado caballos de edades diferentes, pero no menor a un año de edad, (entre 3 y 17 años) y han sido evaluados de forma individual. Las variables que miden fueron también latencias, frecuencias y duración de conductas de huida o exploración ante la presencia del objeto novedoso. Algunos estudios que realizaron repeticiones de la prueba varían de 9 días hasta 1 año (Visser et al., 2001; Seaman et al., 2002; Visser et al., 2002) entre prueba y prueba; hay también estudios que no reportan el tiempo entre prueba y prueba (Visser et al., 2003a). Los resultados reportados no siempre son consistentes en las conductas reportadas o incluso cuando comparan con otras pruebas estandarizadas (Visser et al., 2001; Momozawa et al., 2003).

Las pruebas de miedo hacia el humano y de restricción suelen realizarse juntas, ya que el manejo de los caballos involucra aproximación de un humano. En todos los trabajos publicados, los caballos se manejan de forma individual y en procedimientos variados rutinarios, como manejo por sitios novedosos (un puente), restricción durante inspecciones veterinarias. Las variables más comunes son la cantidad de intentos y tiempo necesario para alcanzar el objetivo. Algunas mediciones son locomotoras, vocalizaciones o expresiones corporales. Solo dos estudios que trabajaron con animales jóvenes (Jeziarski et al., 1999; Visser et al., 2002) reportan repeticiones, pero no encontraron consistencia en sus resultados, probablemente por las diferencias las edades y/o métodos de manejo.

Otras pruebas incluidas dentro de la exposición al objeto novedoso miden también respuestas de sorpresa, variando de la antes mencionada en la forma de presentación del estímulo, en virtud de que para que sea sorpresiva, la presentan de forma súbita. Los estímulos pueden ser objetos sorpresivos (ej. paraguas abriéndose súbitamente, objetos que se caen en la arena o sitio experimental, aerosol de agua (Seaman et al., 2002; Lansade et al., 2007; Villas-Boas et al., 2016).

Como ya se mencionó, Lansade et al. (2007) han sido los únicos en investigar diferencias individuales en etapa pre-destete en pruebas estandarizadas utilizando una población de caballos Welsh y Anglo-árabes a partir de las tres semanas de edad y hasta las 24 semanas de edad. Los autores no encontraron resultados que indiquen la existencia de diferencias individuales, por lo cual no recomiendan seleccionar potros en esta etapa; sin embargo, encontraron que con el paso de la edad y de forma progresiva los potros si tuvieron cambios en la manifestación de conductas relacionadas con “incremento de miedo” (evasión para acercarse a los humanos) y contrariamente, presentaron “ausencia o menos de miedo” (al haber incrementado el contacto con el objeto novedoso). Como ellos mismos explican y como previamente se ha mencionado en el presente trabajo, una de las problemáticas que hay en los diseños experimentales de temperamento animal, es que la interpretación de las conductas desplegadas por los animales no necesariamente es correcta. En este caso, por ejemplo, la ausencia de exploración o proximidad pueden también deberse a mera indiferencia y nada que ver con miedo. Otro punto a discutir del trabajo es la logística de las pruebas: se realizaron tres pruebas al mismo tiempo y en una arena conocida para cada uno de los potros y su madre, pero con la madre restringida. Se ha visto que en potros, las conductas desplegadas muchas veces

dependen de la reacción de la madre (Wolski et al., 1980; Rifá, 1990; Houpt, 2002), que estar restringida como en este caso, puede también afectar.

El proyecto de equipo de Lansade continuó con una serie de publicaciones en el año 2008 usando probablemente a los mismos potros del estudio anterior (razas Welsh pony y Anglo-árabes), a los 8 meses de edad, 1.5 años de edad, y solo algunos a los 2.5 años de edad. En su primer experimento, los autores reportan resultados en pruebas estandarizadas para evaluar la existencia del rasgo de “sociabilidad” (Lansade et al., 2008a) mediante cuatro pruebas: 1) aislamiento social, 2) separación de conespecíficos, 3) atracción hacia conespecíficos, y 4) paso por presencia de conespecífico. La diferencia entre la primera y segunda situación fue que, en la primera se evaluó a cada caballo dentro de una caballeriza aislado de sus conespecíficos sin posibilidad de contacto físico ni comunicación con éstos; en la segunda situación, los caballos fueron separados del caballo observado. En este estudio, resalta el haber encontrado consistencia individual para la cantidad de vocalizaciones emitidas durante la separación de conespecíficos desde los 8 meses de edad y hasta el 1.5 años de edad; igualmente, esta variable se correlacionó con defecación, locomoción y vigilancia durante todas las pruebas. A los 2.5 años, deja de haber consistencia individual en esta variable, y decae notablemente la cantidad de vocalizaciones emitidas. Con estos resultados, los autores concluyeron que las vocalizaciones son un indicador de temperamento en caballos en etapa pre-destete, usando el paradigma de la separación social, al igual que en otras especies como bovinos (Boissy y Bouissou, 1995), borregos y cabras (Price y Thos, 1980; Barnard et al., 2015; Nawroth et al., 2017), cerdos (Leliveld et al., 2017), ratones y gatos (Hudson et al., 2015; Urrutia et al., 2019; Martínez-Byer et al., 2020).



En otra publicación (Lansade et al., 2008b) evaluaron en la misma población y a las mismas edades, la dimensión “miedo” exponiendo a los animales a cuatro pruebas: 1) objeto novedoso en una arena, 2) a un espacio novedoso, 3) sorpresa en libertad, 4) sorpresa durante sujeción de un humano, todas pensadas en ser generadoras de miedo. En la cuarta prueba, y sólo en esta, los investigadores midieron también la frecuencia cardíaca. El estudio reporta estabilidad y correlación a lo largo del tiempo en conductas de exploración durante las tres primeras pruebas: lamer o tocar con la nariz del objeto novedoso, latencia para pisar la arena nueva y comer en ésta, distancia de huida al exponerlos al estímulo sorpresa (abrir una sombrilla), mientras el caballo estaba libre. Los parámetros estuvieron significativamente correlacionados en todas las pruebas, por lo cual los consideran indicadores de “miedo” en caballos. En el diseño experimental, los autores consideraron que existe un posible efecto negativo al evaluar las respuestas de animales sociales aislados previamente reportado en pequeños rumiantes (Romeyer y Bouissou, 1992; Vandenheede et al., 1998; Viérin y Bouissou, 2003), por lo cual previo a las pruebas realizaron sesiones de habituación al lugar (para los potros expuestos a la prueba de objeto novedoso), y al cinto para medición de frecuencia cardíaca. El estudio reporta estabilidad y correlación a lo largo del tiempo en: frecuencia de lamido o tocar con la nariz el objeto novedoso, latencia para pisar la arena nueva y comer en ésta, distancia de huida al exponerlos al estímulo sorpresa (abrir una sombrilla) mientras el caballo estaba libre. No hallaron repetibilidad en la frecuencia cardíaca ni correlación entre variables conductuales y fisiológicas, cabe señalar que para la última prueba no hubo habituación al manejo del humano, y que existían ya otras mediciones cardíacas más precisas previamente usadas en caballos con fines experimentales como la variabilidad de frecuencia cardíaca (Visser et al., 2002; Rietmann

et al., 2004; Applehans y Luecken, 2006; von Borell et al., 2007), de la cual se hablará más adelante en el presente capítulo.

Para su tercera publicación, (Lansade y Bouissou, 2008) se basaron en literatura previa que encontró consistencias individuales en bovinos y pequeños rumiantes durante la presencia de humanos (Price, 1984; Grandin, 1993; Rushen et al., 1999 a, b). Los autores consideraron igualmente, la ventaja de detectar diferencias individuales en potros jóvenes para evitar accidentes durante su manejo (Hausberger et al., 2008). Los potros, en este estudio (54 ponies Welsh y Anglo-árabes de 8 meses, 1.5 y 2.5 años de edad) fueron evaluados mínimo con una repetición (es decir, dos pruebas) de cuatro en total para evaluar la existencia del dominio “reactividad a humanos” previo periodo de habituación a estímulos que podrían intervenir con los resultados: 1) presencia de humano conocido en posición pasiva, 2) presencia de humano conocido en posición activa, 3) interacción de humano desconocido activo, 4) colocación de almartigón y medición de frecuencia cardíaca. Los autores encontraron estabilidad a lo largo del tiempo en las correlaciones entre edad y frecuencia de lamido o mordisqueo hacia el humano posición pasiva, el tiempo que le llevó a una persona familiar o no familiar tocar al caballo, y el tiempo que le llevó ajustar el almartigón. Respecto a la estabilidad entre situaciones, los resultados indicaron que a mayor frecuencia de olfateo, lamido o mordisqueo hacia el humano pasivo, fue más fácil para el humano conocido o desconocido activos el tocarlo y colocarle el almartigón; igualmente, un caballo fácil de tocar puede también ser tocado y colocarle el almartigón con mayor facilidad por un humano no conocido. En conclusión, los autores confirman la existencia de la dimensión “reactividad hacia humanos”, ya sea pasivo o activo, familiar o desconocido desde los 8 meses de edad; destando esta misma estabilidad aún cuando los animales no tienen contacto frecuente con humanos. La reactividad en caballos, a veces

también valorada con pruebas de miedo ha sido evaluada por varios autores que categorizan a los caballos como “poco reactivo” o “muy reactivo” (Wolff et al., 1997; Jezierski et al., 1999; Søndergaard y Halekoh, 2003; Lansade et al., 2004; Henry et al., 2005; Lansade et al., 2008b; Fureix et al., 2009; Maros et al., 2010; Dalla Costa et al., 2015; Pereira-Figueiredo et al., 2017), para este fin también, Kozak et al. (2018) usaron pruebas de 1) manejo, 2) interacción humano-animal y 3) exposición a situaciones novedosas en caballos de 3 a 17 años de edad, concluyendo que solo las pruebas de manejo fueron suficientemente consistentes para evaluar la reactividad en relación a situaciones diarias de manejo, sin embargo, indican necesario no considerar la reactividad emocional como una sola dimensión en virtud de que está influenciada por muchas variables cuya manifestación depende de la prueba aplicada sin ser entonces un indicador ni dimensión única del temperamento del caballo, por lo cual debería de analizarse en varios niveles y dejar de clasificar a los caballos en general, como “más” o “menos” reactivo, de tal suerte que la reactividad emocional es un concepto más amplio que incluye a varios componentes del temperamento, por lo cual evaluarlo con una sola prueba no es posible.

En una cuarta publicación, Lansade et al. (2008c) buscaron la existencia de consistencias individuales en la dimensión de “sensibilidad sensorial” en otras especies no equinas. Esta dimensión se refiere en humanos, a la propensión de un individuo para reaccionar en mayor o menos grado ante estimulación sensorial presente en el medio ambiente (olfativa, gusto, visual, auditiva y táctil). Los autores indican que la sensibilidad a estímulos sensoriales difiere de la percepción porque los individuos perciben dicha estimulación, pero no responden a ella en el mismo grado. En este estudio, 26 ponis Welsh de entre 3 y 4 años de edad, fueron sometidos a cinco intensidades de estímulos para cada órgano sensorial en tres series (A, B, A, siendo A las repeticiones después de 5 meses de la primera). Luego de realizar mediciones sobre la respuesta

ante dichos estímulos y la intensidad ante su exposición, buscaron correlaciones de los resultados con los de las pruebas de temperamento más representativas de los experimentos pasados: de miedo (exposición a objeto novedoso, entrar a una superficie desconocida, respuesta ante estímulo sorpresivo); de aislamiento social; reactividad hacia humanos (humano conocido en posición pasiva y humano conocido en posición activa); actividad locomotora general. Los autores encontraron estabilidad entre exposiciones y repetibilidad a los 5 meses después a la sensibilidad táctil, gusto-olfatoria, auditiva y visual; sin embargo, no hubo relación entre dichas dimensiones ni con las pruebas de temperamento (miedo, aislamiento social y reactividad a humanos). La falta de asociación entre las cuatro dimensiones sensoriales pudiera significar que la respuesta dada ante cada sentido sea una dimensión independiente, sin embargo, esto no ha sido comprobado.

A partir del año 2001, el equipo de Visser et al. realizaron también una serie de estudios con 41 potros warmblood a los 9, 10, 21 y 22 meses de edad con el objeto de investigar el desarrollo de las diferencias individuales en el temperamento de animales jóvenes y ya destetados. Los experimentadores, primero sometieron a esta población de potros a dos pruebas: 1) de objeto novedoso y 2) prueba de manejo. Ellos encontraron que todas las variables conductuales de la prueba de manejo y la mayoría de las variables del objeto novedoso tuvieron una correlación positiva. Al analizar con componentes principales (PCA), encontraron que las conductas podían categorizarse en dos dimensiones denominadas “reactividad” y “sensibilidad” durante la prueba de objeto novedoso; a su vez, como “paciencia” y como “disposición para trabajar” en la prueba de manejo. Hallaron también que las dimensiones “reactividad” en el objeto novedoso, y “paciencia” en la prueba de manejo se correlacionaron positivamente entre sí durante los dos años de pruebas. “Sensibilidad” en la prueba del objeto novedoso, y “disposición para trabajar”

en la prueba de manejo, se correlacionaron positivamente sólo durante el primer año pero no después. De los rasgos que definieron los autores, solamente “reactividad” mostró consistencia individual en todas las edades. En este documento, los autores discuten que generalmente, las conductas en mamíferos suelen clasificarse en referencia a lo que se conoce de roedores (Manteca y Deag, 1993; Boissy y Bouissou, 1995); por ejemplo, durante pruebas de exposición a ambiente novedoso o a objeto novedoso, la locomoción o la inmovilidad se leen como indicadores de poco o mucho miedo, respectivamente (Boissy y Bouissou, 1995; Hopster et al., 1999); sin embargo, en caballos esta lectura podría no aplicar, ya que el nivel de locomoción no necesariamente indica miedo. Según los resultados del análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) el total de la conducta en la prueba de objeto novedoso se atribuye a “reactividad” y a “sensibilidad”, lo cual contradice la hipótesis que tenían los autores: que los animales más reactivos (con mayor nivel de locomoción), así como los altamente sensibles en la prueba de objeto novedoso (mayor porcentaje de observación hacia el objeto novedoso), serían los más miedosos. Se cree que la falta de consistencia en conductas a lo largo del tiempo puede darse por madurez (entrada a la pubertad), como se ha visto en bovinos y perros (Hopster, 1998; Neave et al., 2020).

Dadas las desventajas y dificultad que representa la mera lectura de conductas es recomendable integrar evaluaciones fisiológicas a las pruebas de comportamiento. En caballos bajo situaciones experimentales de estrés (sea con fines de bienestar o diferencias individuales consistentes en el tiempo), suelen medirse niveles hormonales, principalmente de cortisol; plasmático: Friend (2000), salival: Schmidt et al. (2010); Henry et al. (2012); frecuencia cardíaca (Fc): Shanahan, (2003), Rietmann et al. (2004). Ambos parámetros han demostrado

ser poco confiables y difíciles en su interpretación (Brousset et al., 2005; Henry et al., 2012).

Actualmente, el parámetro fisiológico que parece altamente válido y fácil de obtener en mamíferos, incluyendo al caballo, es la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VaFc) (Kuwahara et al., 1996; Visser et al., 2001; Visser et al., 2002; Gehrke et al., 2011; Mengoli et al., 2014). La Fc (latidos/min) representa el efecto neto de la innervación parasimpática (responsable de disminuirla), y de las ramas simpáticas (responsables de su aceleración). Los estresores pueden inducir un cambio en el balance autonómico, provocando dominancia simpática o parasimpática (Visser et al., 2002). Porges (1995) postuló que la disminución en la actividad del nervio vago (parasimpático eferente), limita la capacidad fisiológica y conductual para lidiar ante eventos estresantes, por lo que la medición de parámetros del tono vagal son útiles para conocer la vulnerabilidad y magnitud individual de respuestas estresantes; de tal suerte, que dichas diferencias son reflejo del temperamento individual. El postulado de Porges, ha sido exitosamente probado en caballos por diversos autores, por lo cual la VaFc y sus parámetros cuantificables (Fc/min, desviación estándar entre intervalos de latidos, raíz cuadrada de diferencias sucesivas entre latidos, componentes de alta y baja frecuencia, e índice entre los componentes de alta y baja frecuencia), son prometedores para identificación de personalidad, emotividad y/o temperamento con resultados consistentes a corto y largo plazo (Visser et al., 2001; Visser et al., 2002; Rietmann et al., 2004; Gehrke et al., 2011; von Borstel et al., 2011; Mengoli et al., 2014; Nagel et al., 2015; Stucke et al., 2015; Pierard et al., 2017; Norton et al., 2018).

Con la población de caballos jóvenes previamente mencionada, y en las mismas situaciones experimentales, el equipo de Visser et al. (2002) publicaron un segundo trabajo reportando la

respuesta fisiológica a través de la frecuencia cardiaca (Fc) y de las variables de dominio de variabilidad de frecuencia cardiaca (VaFc): SDRR y RMSSD (cuya definición se encuentra en el Cuadro 2), pero no mencionan las variables de frecuencia. Este documento, es el primero que usa la VaFc para estudiar diferencias individuales en caballos y con pruebas repetidas.

La Fc puede incrementar en respuesta a estímulos sorprendidos al igual que durante la actividad física (hasta 110 latidos por minuto), por lo cual los autores consideraron en su estadística estas variaciones en relación a la división de los grupos (mitad bajo entrenamiento y la otra sin entrenamiento), al igual que por edades y sexo. Los valores fisiológicos se realizaron en reposo (basales) para obtener la diferencia de las mismas, al exponerse a la prueba de temperamento. Se encontraron diferencias individuales en la respuesta de la Fc en ambas pruebas (objeto novedoso y manejo); si bien la Fc puede ser alterada por influencia tanto simpática como parasimpática (Hamlin et al., 1972; Porges, 1991; McKeever et al., 2013), lo interesante es que la diferencia proporcional entre individuos fue consistente, por lo cual los autores indican que ésta se debe a que cada animal tiene particularidades en sus estrategias adaptativas ante demandas del ambiente. Encontraron diferencia por grupos, es decir entre animales que si tuvieron entrenamiento previo y los que no, lo cual explican por la constante exposición que tuvieron los animales que si recibieron manejo previo. La diferencia en reactividad entre animales con y sin entrenamiento fue más notoria en la prueba de manejo dados los valores de dominio de la VaFc, que indicaron mayor predominio simpático y menor parasimpático. Este hallazgo es importante, ya que probablemente el efecto del manejador conocido ayudó también a disminuir la respuesta de aquellos animales que si recibieron manejo previo (Cohen y Wills, 1985; Christenfeld y Gerin, 2000). Las variables SDRR y RMSSD mostraron correlaciones positivas dentro de cada individuo y durante todas las edades, aunque

más robustas durante el segundo año. Estos parámetros mostraron también correlaciones entre el primer y segundo año de edad. Como ya se mencionó, la publicación de Visser et al., 2002 utilizó por primera vez algunas de las variables de VaFc que, aunque no fueron todas ni las más relevantes para discernir entre la influencia simpática de la parasimpática, dio pie al uso de éstas en posteriores experimentos de temperamento en caballos. Respecto a las variables conductuales, encontraron consistencia dentro del primer y segundo año, pero no entre años (Visser et al., 2001), probablemente por efectos de madurez una vez entrada la pubertad (Jeziński et al., 1999; Visser et al., 2001).

Continuando con esta población de caballos 41 warmblood longitudinalmente, el laboratorio de (Visser et al., 2003b) realizaron pruebas de temperamento y correlaciones entre pruebas para estudiar el desempeño de éstos en salto de obstáculos. Las pruebas que realizaron fueron de objeto novedoso, de manejo, aprendizaje de elusión de estímulo y aprendizaje de estímulo generador de premio durante el primer año del estudio (2º año de vida de los caballos); para el segundo año de estudio (3 de edad de los animales), los caballos fueron domados y enseñados a saltar en salto de obstáculos. Para algunas de las pruebas de temperamento y salto usaron también variables de VaFc (RMSSD y Fc). La RMSSD y las respuestas conductuales en la prueba de manejo fueron las únicas correlacionadas en ambos años. Para resto de las variables conductuales, fisiológicas y de salto no mostraron asociaciones, por lo cual es difícil hacer conclusiones.

Nuevamente, (Visser et al., 2003a) evaluaron a 18 caballos warmblood de entre 5-15 años de edad en pruebas estandarizadas de exposición a 1) objeto novedoso, y 2) prueba de manejo previamente descritas y nuevamente, utilizaron variabilidad de frecuencia cardiaca sin especificar qué variable de la VaFc fue considerada, pero reportan una correlación negativame



entre este valor y la posición baja de la cabeza y con explorar otras cosas, excepto el objeto novedoso. Hubo también una correlación positiva entre conductas de exploración de otros objetos, excepto el novedoso. Posterior a las pruebas conductuales, los autores realizaron un cuestionario a jinetes expertos sobre características del temperamento de los animales, mismos que hubo concordancia entre los resultados de los animales y las evaluaciones de sus jinetes.

Como aquí se menciona, existe aún mucho que mejorar respecto a la metodología e interpretación de las conductas de caballos en pruebas de temperamento, además de una enorme necesidad para la selección de individuos. La mayoría de las conductas evaluadas a partir de pruebas estandarizadas, se consideran y clasifican con poca objetividad, asumiendo estar generando respuestas de miedo. Probablemente para evitar efecto de habituación a la exposición de estímulos, algunos experimentos no realizan repeticiones de pruebas (Goodenough et al., 2009), olvidando la relevancia del requerimiento de consistencia a lo largo del tiempo. Por otro lado, las poblaciones de caballos que han usado generalmente son adultos o jóvenes, pero no en etapas infantiles, y no necesariamente con la misma historia de manejo o bajo situaciones homogéneas al momento de realizar los experimentos.

### **3. Objetivo**

Estudiar la existencia y consistencia de diferencias individuales del caballo doméstico (*Equus caballus*) en respuestas conductuales y fisiológicas ante un evento estresante con relevancia biológica (separaciones maternas y sociales) durante el primer año de vida, comenzando en edad temprana (próxima al nacimiento).

### **4. Hipótesis**

Se encontrarán diferencias individuales consistentes en variables conductuales y fisiológicas de los potros durante el primer año de vida, y los dos dominios de respuesta (conductual y fisiológico) mismas que estarán correlacionadas.

## **5. Presentación de estudios realizados**

Previo a la realización de los experimentos, el protocolo fue enviado y aprobado bajo el protocolo número DC-2018/1-5 por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación UNAM, para su aprobación en cumplimiento de las normas éticas para el trabajo con animales.

### **5.1 Animales**

Para el presente trabajo, se usaron 33 potros de raza Azteca (17 hembras y 16 machos). Los animales fueron integrados al estudio conforme nacieron, considerando siempre estar sanos al momento de las pruebas previo examen físico general y dentro de los parámetros de edad. Un total de 30 potros culminaron las seis pruebas de separación (14 machos y 16 hembras), tres animales fueron eliminados del estudio: uno por enfermedad, otro por muerte y el tercero por agresión de la madre. Sólo una de las madres de dichos animales era primípara.

La creación de la raza Azteca empezó en 1969 en la Alta Escuela Mexicana de Jinetes de Texcoco, en la región del Valle de México para ser utilizado para charrería. Se formó con sangre andaluza y cuarto de milla. Se caracterizan por ser caballos ágiles, fuertes y rápidos con capacidades de trabajo, por lo que además de ser utilizados en la actualidad para la charrería, también se hace en rejoneo y alta escuela. Físicamente deben de tener una alzada mayor a 1.4 m a la cruz, peso promedio de 540 kg, cabeza recta o ligeramente convexa de perfil dada la relación con sangre andaluza. Su cuello es musculoso y arqueado. Predominan en colores castaños y tordillos, aunque todos están aceptados (Elizondo y Vargas Roa, 1989).

Estos animales fueron seleccionados para trabajo policial en la Unidad de Policía Metropolitana Montada de la Ciudad de México (UPM-Montada, CDMX) dada su versatilidad, obediencia y adaptabilidad al trabajo de calle y tumultos además de ser una raza mexicana.



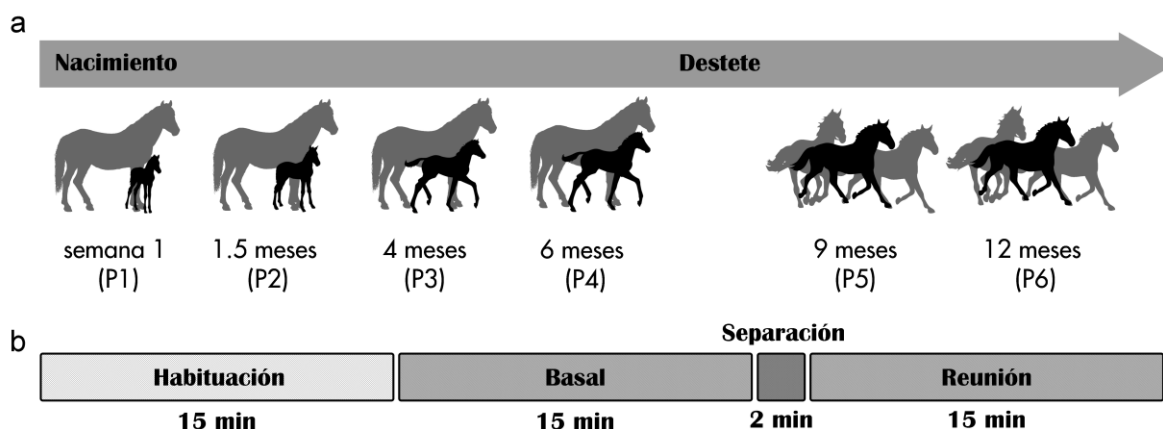
**Figura 1.** Ejemplares de raza Azteca de la UPM-Montada patrullando en la Alameda Central de la Ciudad de México. Imagen extraída de <http://puentelibre.mx/noticia/>

## ***5.2 Pruebas experimentales***

Las seis pruebas se realizaron en la UPM-Montada, donde a la fecha, mantienen un programa de cría durante todo el año, de tal forma que los nacimientos fueron constantes a lo largo del año de trabajo. Igualmente, los caballos se mantuvieron bajo situaciones homogéneas de manejo durante todo el estudio.

El presente trabajo se diseñó en dos etapas y utilizando siempre a los mismos individuos.

Las dos etapas fueron 1) pre-destete, y 2) post-destete. La Figura 2a ilustra la edad en la que se realizaron cada una de las pruebas. El diseño experimental se ajustó a las instalaciones y manejo de la UPM-Montada. Las primeras cuatro pruebas (P1-P4) fueron de separación materna en el área de maternidad. A los seis meses de edad, los animales fueron destetados súbitamente y llevados al corral de destetados, donde protocolariamente permanecieron hasta el año de edad para posteriormente, ser divididos por sexos. Los potros participantes de este trabajo tuvieron tres meses de adaptación al nuevo entorno social tras haber sido destetados, y luego de lo cual se realizaron dos pruebas de separación social (P5 y P6) del grupo de jóvenes destetados.



**Figura 2.** a) Edades de los animales durante cada prueba de separación materna (P1-P4) y separación social (P5 y P6). El destete se llevó a cabo a los 6 meses de edad. b) Representa las etapas y tiempos de cada una de las pruebas realizadas.

Al inicio de cada prueba se realizó un examen físico de los animales, garantizando que estuvieran en buen estado de salud y se les ajustó el equipo (Polar Equine V800, Kempele, Finland) para registro de datos cardíacos (Cuadro 2). Igualmente, las pruebas fueron video grabadas (GoPro 4 Session, GoPro Inc., CA, EUA). Las grabaciones cardíacas y de video fueron continuas, de forma que los periodos o etapas de cada una de las pruebas fueron

marcadas en video por una señal de los experimentadores, y registrada la hora precisa en hojas de datos para su posterior lectura y análisis. La Figura 2b ilustra los periodos de cada una de las pruebas. Cada prueba tuvo una duración de 47 minutos divididos en cuatro momentos: “habitación, basal, separación y reunión”; de éstas, se consideraron para su análisis “basal, separación y reunión”. El periodo de habitación no se consideró tomando en cuenta que el manejo para la colocación del equipo Polar®, la proximidad de los experimentadores para iniciar o pausar las grabaciones podría interferir con los resultados deseados del efecto de la mera separación maternal o social. Durante los periodos intermedios entre basal y separación, así como entre separación y reunión no se analizaron conductas ni valores fisiológicos debido al movimiento de experimentadores dentro de la caballeriza y del corral para desplazar a la madre y al grupo social. En ambos periodos (pre y post-destete), se realizaron las mismas mediciones conductuales (Cuadro 1) y fisiológicas (Cuadro 2).

**Cuadro 1**  
Mediciones conductuales

Conducta	Descripción	Unidad
Alerta	Cabeza y orejas erguidas con o sin desplazamiento corporal*	% de tiempo
Vocalizaciones	Relinchidos. No tos ni estornudos	#/min
Cola levantada	Maslo de la cola evidentemente erguido manteniendo espacio entre la crin y la punta de la nalga	% de tiempo
Movimientos de cabeza	Desplazamientos exagerados de la cabeza y cuello sobre el plano horizontal o vertical	#/min
Locomoción	Desplazamiento corporal completo	% de tiempo
Vocalizaciones maternas*	Relinchidos emitidos por la madre durante la separación	#/min

\* Usado como covariable sólo para el análisis del periodo pre-destete

**Cuadro 2**

## Mediciones de variabilidad de frecuencia cardiaca (VaFc)

Variable	Descripción y significado fisiológico	Unidad
Promedio R-R	Promedio de los intervalos sucesivos de R-R*. Reflejan el balance de los tonos simpático y parasimpático. Durante periodos de estrés, la variabilidad R-R disminuye.	ms
STDRR	Desviación estandar de todos los intervalos R-R medidos. Indica la variabilidad bajo la influencia de las dos ramas (simpática y parasimpática) del sistema nervioso central	ms
RMSSD	Raíz cuadrada del valor medio de la suma de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos R-R sucesivos. Indica las variaciones a corto plazo de los intervalos RR y se asocia con influencia del sistema nervioso parasimpático	ms
LF / HF	Proporción entre las frecuencias baja (LF <sup>§</sup> ) y alta (HF <sup>†</sup> ), componentes análisis espectral de la VaFc. Refleja la influencia simpática (LF) y parasimpática (HF) del equilibrio simpato-vagal. Un incremento en esta proporción sugiere dominio simpático en el sistema nervioso central	s <sup>2</sup> /Hz

\*Fluctuaciones a corto plazo en el intervalo de latido a latido cardiaco (de onda R a onda R en el electrocardiograma). <sup>§</sup>Se denomina LF por su abreviacion en inglés (low frequency) y <sup>†</sup> HF por (high frequency).

## 6. Primer artículo, publicado

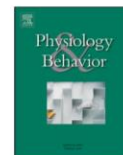
### *Diferencias individuales en el comportamiento y en la variabilidad de frecuencia cardiaca a lo largo del periodo pre-destete en el caballo doméstico en respuesta a un estresor ecológicamente relevante*

#### **Resumen**

El estudio de diferencias individuales en comportamiento y fisiología ha ganado interés entre biólogos conductuales. Algunas preguntas relevantes en este campo de investigación, incluyen: qué tan temprano surgen dichas diferencias en la vida del individuo, y hasta qué edad o etapa se mantiene estables a lo largo de la vida. Debido a lo demandante que resultan los estudios longitudinales, falta aún mucha información al respecto en mamíferos, particularmente en especies grandes y de vida prolongada. El objetivo de este estudio fue buscar diferencias individuales estables en el comportamiento y fisiología del caballo doméstico, comenzando desde edad muy temprana, igualmente averiguar si existían correlaciones entre ambos parámetros. Para este fin, se usaron 30 potros de raza Azteca, mantenidos desde su nacimiento en situaciones de manejo homogéneas. A dichos animales se les sometió a breves separaciones maternas en cuatro ocasiones, comenzando a la primera semana de edad y continuando hasta los seis meses de edad, antes de su destete. Encontramos consistencia a lo largo de los 12 meses de estudio, en las diferencias individuales tanto para variables conductuales como en la variabilidad de frecuencia cardiaca de los potros, así como correlaciones entre ambos parámetros desde muy temprana edad. Estos resultados contribuyen para tener una mejor comprensión sobre la expresión de diferencias individuales fisiológicas y conductuales desde



la perspectiva ontogénica; de forma aplicada, puede también contribuir en un futuro para seleccionar caballos de fines zotécnicos específicos con distintos requerimientos de reactividad, contribuyendo así al bienestar del caballo y del humano, por seguridad y por economía.



## Individual differences in behavior and heart rate variability across the preweaning period in the domestic horse in response to an ecologically relevant stressor

Lucía Pérez Manrique<sup>a</sup>, Robyn Hudson<sup>b,\*</sup>, Oxána Bánszegi<sup>b</sup>, Péter Szenczi<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Av. Universidad 3000, Edificio 6. Delegación Coyoacán, Col. Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Laboratorio Psicobiología del Desarrollo, Av. Universidad 3000, Edificio B. Delegación Coyoacán, Col. Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Unidad Psicopatología y Desarrollo, Calz. México-Xochimilco 101, 14370, Tlalpan, Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Cátedras CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Individual differences  
Development  
*Equus caballus*  
Mother-foal separation  
Behavior  
Heart rate variability

### ABSTRACT

The study of individual differences in behavior and physiology has attracted considerable interest among behavioral biologists. Important questions include how early in life such differences emerge and to what extent they remain stable across development. Due to the demanding nature of longitudinal studies, there is still a lack of information on this in mammals, especially in large, long-lived species. Our aim in this study was to look for stable individual differences in behavior and physiology during early development in the domestic horse and for correlations between the two parameters. We tested 30 Azteca-breed foals kept under standard conditions by briefly separating them from their mother in four repeated tests beginning at the first postnatal week until the foals were six months old, before they were weaned. Individual differences in behavior and heart rate variability of foals in response to brief maternal separations were consistent and were correlated from a very early age. These findings contribute to an understanding of the expression of individual differences in physiology and behavior from a developmental perspective and may help in the future selection of horses for functional contexts that require different levels of reactivity, thereby contributing to horse welfare and to human safety and economy.

### 1. Introduction

The study of stable individual differences in behavior, commonly defined as consistency through time and/or across contexts (also referred to as personality, temperament or coping style) has attracted considerable attention in the last decades in a variety of scientific fields and has been found across a wide range of taxa [6,11,33,44]. Individual differences in behavior are considered to represent important adaptive strategies with consequences for individual fitness, species distributions (including species invasions) and the rate of speciation [8,19,54,87]. In domesticated species such differences can also have significant economic and welfare consequences [28]. Individual differences in behavior are also often associated with consistent individual differences in physiology, including metabolic processes [14], stress physiology, and life-history characteristics [35,42,43,63]. Suites of correlated,

repeatable behavioral and/or physiological traits are sometimes referred to as syndromes [69], and such non-independence of traits has been considered to contribute significantly to evolutionary processes [22].

A number of studies have shown that individual differences in behavior and physiology among conspecifics may appear early in life [77], but also that such differences may change across life stages and are not necessarily stable across an individual's life span [70,71,76]. Hence, a developmental perspective and longitudinal studies are needed to investigate to what extent individual differences in behavioral and physiological traits change or persist across different life stages [25,34,77]. Due to the demanding nature of longitudinal studies, including the challenge of repeatedly testing animals across ontogenetic change, there is still little information on the existence of consistent individual differences in behavioral and physiological phenotypes

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [rhudson@biomedicas.unam.mx](mailto:rhudson@biomedicas.unam.mx) (R. Hudson), [peter.szenczi@gmail.com](mailto:peter.szenczi@gmail.com) (P. Szenczi).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112652>

Received 24 March 2019; Received in revised form 23 July 2019; Accepted 12 August 2019

Available online 13 August 2019

0031-9384/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

during development in mammals, especially in large, long-lived species [6,72,77].

Heart rate variability (HRV) assessment is a useful method for investigating individual differences in the physiological response to stress. It is non-invasive and in contrast to more commonly used hormonal measures, allows real time continuous recording of an individual's physiological state. Measuring HRV is extensively used in human medicine as well as in animal research, including in the horse; [51,74,81], to investigate changes in the sympatho-vagal balance related to pathological conditions [2,60,64], to stress levels [53,66,68], and to emotional states [1,82,83]. The predominance of parasympathetic activity under resting conditions is reflected by a slower heart rate – longer beat-to-beat intervals (mean R-R), an increase in STDRR and RMSSD, and a decrease in LF / HF ratio (for definitions see Table 2). In stressful situations, however, there is a shift towards sympathetic dominance, with an opposite change in the above-mentioned values [45,68,74,84].

The domestic horse (*Equus caballus*) is a promising model to study the development of individual differences in behavior and physiology. Despite its long history of domestication, the horse has undergone relatively minor morphological, behavioral and physiological changes compared to some other domesticated species [7,78]. It is also relatively easy to test the precocial young from an early age. From an applied perspective, horses are still used for a wide variety of purposes and selecting the temperamentally most appropriate individuals for particular contexts is of considerable economic and welfare significance as well as for the safety of their human handlers [13,58]. Nevertheless, despite a number of studies of individual differences in behavior only few have tested the same individuals repeatedly over extended periods or included physiological measures [46,67,82,83], and to our knowledge only one study has investigated the stability of individual differences in behavior in foals before weaning [47]. Although individual differences in behavioral and HRV parameters have been shown in horses, still only few experimental studies have measured both longitudinally in repeated tests [24,83,85], and none from soon after birth.

For many young ungulates, including the horse, separation from the mother represents a potentially threatening and highly stressful situation [37,52,55,64]. Social separation tests can be briefly implemented from an early age, and have been found useful for measuring individual differences in stress responses in several ungulate species, for example in pigs [29,49], calves [86], sheep and goats [57], and in juvenile horses [48].

It was therefore our aim in the present study to investigate the existence of stable individual differences in behavioral and physiological responses to a social stressor during the preweaning period in the domestic horse, starting soon after birth. To do so, we recorded foals' responses on repeated occasions in a biologically relevant context; brief separation from their mother. We were particularly interested in examining the association between the measured behavioral and physiological parameters, with the long-term possibility of contributing to the design of tests for selecting young horses according to the demands of different applied contexts.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethics note

The experimental protocol complied with the ARRIVE guidelines for the care and use of animals in research [41], with the European Union Directive 2010/63/EU for animal experiments, and with the National Guide for the Production, Care and Use of Laboratory Animals, Mexico (Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999). The project was approved by SICUAE (Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales), Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal FMVZ- FESC-UIB, UNAM, protocol number DC-2018/1-5.

### 2.2. Animals, housing and management

A total of 33 Azteca-breed foals started in the study (16 males and 17 females) from 33 mares, all but one of which were multiparous, and nine breeding stallions. Two male foals were excluded for health reasons and one female because of the mother's aggression towards the experimenters during handling. Thus, a total of 30 foals (14 males and 16 females) finished the six-month preweaning test period.

Tests were performed at the Metropolitan Mounted Police Unit of Mexico City. All horses had been raised and housed in that facility under the same conditions and under daily veterinary supervision. Two months before giving birth the mares were moved to individual stalls (4 × 4 m) in the maternity facility. On the day of delivery (postnatal day 0, PND 0), the mare and newborn foal were medically assessed and monitored continuously by the veterinary staff for the next 36 h. From PND 2 until weaning at 6 months, veterinarians checked each mare and foal twice a day during medical rounds (08:00 and 18:00 h). While in the maternity facility mares and foals were fed twice a day with hay, alfalfa and a commercial oat-based horse feed (Impetu®, Montana Grain, Mexico) and had permanent access to water. After the first postnatal week, each foal with its mother was turned out daily to a corral for one hour of free exercise. At four weeks, they were turned out with two or three same-age mother-foal dyads, and at six weeks these small groups were combined to form a larger similarly aged cohort of mother-foal dyads. They then received four hours of daily turnouts until the foals were permanently separated from their mothers at six months of age.

### 2.3. Test procedure

Testing took place between 10:00 and 15:00 h in the stalls assigned for the study (stalls "A" and "B"), which were separated by an empty stall (Fig. 1). Before testing, video cameras that included audio recording (GoPro 4 Session, GoPro Inc., CA, USA) were mounted in both stalls, which were fully enclosed by solid walls on three sides. One of the experimenters then fitted a belt with non-invasive heart rate sensors (Polar Equine V800, Kempele, Finland) on the foal. The electrode band was coated with water-base gel (Ultra Sonic®, Mexico City) to increase contact between the foal's skin and the device. The experimenters led the foal and its mother into stall A, and started the video and heart rate equipment, which ran for the entire test session.

After a 15-min "habituation period", recording of behavior and heart rate started for a 15-min "baseline period". When the baseline period finished, experimenter 1 (E1) and experimenter 2 (E2) entered stall A. E1 led the mare to stall B while E2 held the foal inside the stall to prevent it from following its mother. Once the mare was secured in stall B, both experimenters left the stalls and the 2-min "separation period" began. We used such brief separation to minimize stress to the mothers and foals (see section 3 below). During separation, mares and foals had no visual but did have auditory contact. At the end of the separation period E1 led the mare back to stall A where the 15-min "reunion period" started. The separation test described above was conducted for the first time when foals were (mean, ± SD) 6.5 ± 2.7 days old (T1) and repeated when they were 47.5 ± 6.6 days old (T2), 126.9 ± 7.2 days old (T3), and 182.2 ± 8.9 days old (T4) just before they were permanently separated from their mother at weaning.

### 2.4. Measurements

The behavioral variables from the video recordings were coded using Solomon Coder software (Version beta 17.02.15, [59]). Analyzed behaviors (Table 1) were taken from various temperament tests in horses [16,37,48,56,66,85,88]. As during the baseline and reunion periods the foals showed almost no stress-related behaviors (e.g. alertness, vocalization) we analyzed these measurements only during separation.

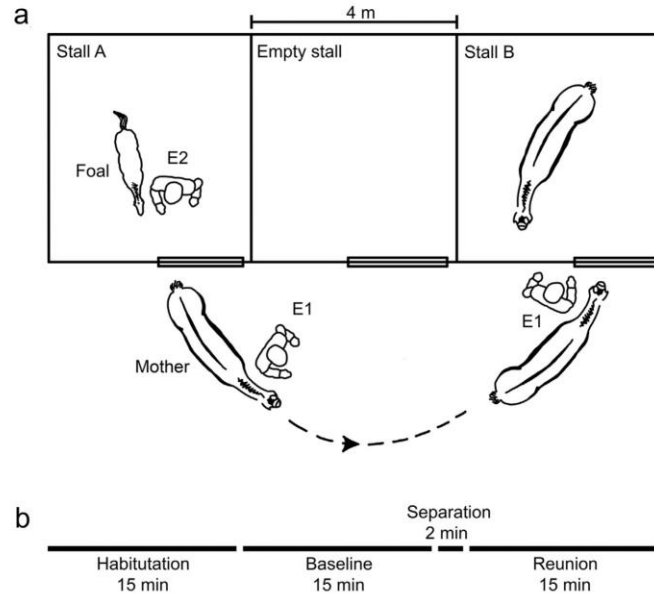


Fig. 1. (a) Schematic overview of the test situation, and (b) the duration of each of the test periods (time line). During separation, the mother was taken to stall B while the foal remained in stall A. The mother was led back to stall A for the reunion period. E1 and E2 represent experimenters 1 and 2.

For the analysis of HRV variables, Kubios HRV® software (version 2.2) was used [75]. Possible errors in HRV reading and data anomalies were detected by the software using a predictive correction algorithm, achieved by the cubic spline interpolation method at a default rate of 4 Hz. The measured time-domain and frequency-domain variables are shown in Table 2. For the frequency-domain, Fast Fourier Transformation (FFT) analyses were carried out following the settings from von Borell et al. [84] even though these are for foals older than six months (personal communication by J. Marchant-Forde). Frequency bands for FFT were low frequency (LF) from 0.04–0.13 Hz and high frequency (HF) from 0.13–0.26 Hz from which the LF / HF ratio was calculated. HRV variables for time- and frequency-domains were calculated for each 5 min of the baseline period and then averaged. The separation period was analyzed for its entire duration (2 min). We then calculated the percent change in the HRV variables from baseline to separation and from separation to reunion and used this for all analyses. To analyze stable individual differences in the speed of recovery after reunion with the mother - because in contrast to baseline this was a dynamic period - we selected the second 5-min section in the recovery period and calculated the percent difference in values for each of the variables in comparison to their baseline values.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the program R, version 3.4.1 [62]. We analyzed the repeatability of individuals' behavioral and HRV measures across the four ages as the proportion of phenotypic variation that can be attributed to between-subject variation [50] by calculating linear mixed model (LMM)-based intra-class correlations (ICC) using the R package rptR [73]. Individual identity was used as a random factor while sex and age of foals as well as the rate of mothers' vocalizations during separations were included in all models. For count data we calculated frequency scores (#/min). Homoscedasticity and normality of the error distribution were checked visually by plotting residuals versus predicted values and by normal quantile plots. Alertness, tail raised and LF / HF ratio were log-transformed to be eligible for use in linear mixed models. For all intra-class correlations we assessed 95% confidence intervals by 1000 bootstrap steps, and P-values were calculated by 1000 permutations. Variance decomposition analyses, when used, were also carried out using the rptR package.

To investigate the possible association between behavioral and HRV variables, first we performed Principal Component Analysis (PCA) on them independently and for each age group so as to reduce the number of dimensions using spectral decomposition assuming correlation matrices. No rotations were used. Since PCA can be sensitive to values of different magnitude all variables were standardized within their age

Table 1  
The recorded behavioral variables.

Variable	Description	Unit
Alertness	The head is raised and the ears pricked forward with or without displacement of the body.	% time
Vocalizations	Whinny, squeal, or nicker. Not snorts or coughs.	# / min
Tail raised	The tail bone is raised, keeping the hair of the tail free from contact with the body.	% time
Head tosses	Exaggerated displacement of head and neck in the horizontal or vertical plane.	# / min
Locomotion	Time spent moving with full body displacement.	% time
Maternal vocalizations	Whinny, squeal, or nicker from the mother during the separation. Used as a covariate in the analysis.	# / min

**Table 2**  
Heart rate variability (HRV) measures.

Variable	Description and physiological significance	Unit
Mean R-R	Mean of the successive beat-to-beat intervals.	ms
STDRR	Standard deviation of the R-R (beat-to-beat) intervals. Indicator of the variability under the influence of the two branches of the autonomic nervous system.	ms
RMSSD	Root mean square of successive beat-to-beat interval differences. It represents high-frequency short-term variation of the R-R intervals mainly due to peripheral nervous system, vagal activity. It is less susceptible to respiration than other measures of HRV.	ms
LF / HF	Ratio of the low frequency (LF) and high frequency (HF) components of the power spectrum, reflecting the sympathetic (LF) and parasympathetic (HF) constituents as an indicator of sympatho-vagal equilibrium. Increase in the LF/HF ratio suggests predominance of the sympathetic nervous system.	s <sup>2</sup> /Hz

groups prior to analysis using *z*-scores. Since phenotypic correlations between traits may originate from two sources, (i) from individuals' average levels of two traits: between-individual correlation or (ii) from individuals' change in behavior: a within-individual correlation [12,20,21,23], we calculated between-individual and within-individual (residual) correlations by using multivariate linear mixed models with the R package *sommer* [17,18] to partition possible phenotypic correlations between the traits.

To check for possible effects of maternal vocalization, even though it was included in the models of repeatability, repeated measures correlations were performed between maternal vocalization rate and all variables – behavioral and HRV – using the R package *rncorr* [3] with 1000 bootstrap resamples.

Inter-rater reliability for behavioral variables was assessed by re-coding 20 randomly selected videos for 20 different foals and taken from each of the four age classes (17% of videos) by an independent observer blind to the purpose of the study. We calculated Cohen's  $\kappa$  for count data, and GLMM-based intra-class correlations for continuous variables using the R package *irr* [30]. We obtained high inter-rater concordances for all variables (alertness:  $R_{ICC} = 0.79$ , number of vocalizations:  $\kappa = 0.95$ , tail raised:  $R_{ICC} = 0.89$ , head tosses:  $\kappa = 0.88$ , locomotion:  $R_{ICC} = 0.92$ ). Inter-rater reliability for HRV measures was not assessed as these measures were calculated automatically (objectively) by the Kubios HRV<sup>®</sup> software.

### 3. Results

When the mares were taken out of stall A (Fig. 1) the foals responded immediately with behaviors indicative of distress such as high-pitched vocalizations, pushing or rearing up against the stall door, and/or intense locomotion. Two minutes were clearly sufficient to record the foals' reaction to separation and we decided that longer might risk the safety of the animals and/or experimenters.

#### 3.1. Repeatability of behavioral measures

At all ages and for all animals the percent time the foals were in an alert state during the separation period was high (Table 3). Thus, we

**Table 3**  
Mean  $\pm$  SD of the behavioral measures during maternal separation tests. T1 = 6.5  $\pm$  2.7 days old; T2 = 47.5  $\pm$  6.6 days old; T3 = 126.9  $\pm$  7.2 days old; T4 = 182.2  $\pm$  8.9 days old.

Behavioral variable	T1	T2	T3	T4
Alert (% time)	93.1 $\pm$ 44.8	97.5 $\pm$ 44.8	93.2 $\pm$ 43.5	86.2 $\pm$ 40.5
Vocalizations (#/min)	16.6 $\pm$ 9.0	13.0 $\pm$ 7.5	10.8 $\pm$ 6.3	8.8 $\pm$ 5.0
Tail raised (% time)	72.1 $\pm$ 36.2	88.2 $\pm$ 41.9	80.3 $\pm$ 39.8	82.3 $\pm$ 39.6
Head tosses (#/min)	2.5 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 1.4	2.4 $\pm$ 1.7	1.8 $\pm$ 1.1
Locomotion (% time)	58.4 $\pm$ 15	70.9 $\pm$ 15.4	70.9 $\pm$ 16.1	61.7 $\pm$ 16.4
Maternal vocalizations (#/min)	13.7 $\pm$ 7.0	11.6 $\pm$ 5.7	8.8 $\pm$ 4.6	7.1 $\pm$ 6.0

could not find stable individual differences in this trait (ICC:  $R = 0.1$ , CI 95% [0, 0.30],  $P = .14$ ) as the average between-individual variance ( $0.1 \pm 0.09$  SE) was lower than the average within-individual variance ( $0.89 \pm 0.14$  SE).

Vocalization rate showed consistent inter-individual differences from the first week (T1) until the sixth month of age (T4) ( $R = 0.35$ , CI 95% = [0.13, 0.56],  $P < .001$ ). Percent time with the tail raised also showed individual consistency across the six-month study period ( $R = 0.34$ , CI 95% = [0.12, 0.55],  $P = .005$ ). Although the rate of head tosses was repeatable across the four tests ( $R = 0.17$ , CI 95% = [0.00, 0.39],  $P = .03$ ), given the low  $R$  and lower limit of the confidence interval at zero we do not consider this as meaningful. At all ages, most foals started walking vigorously and trotting when the mother was led away (Table 3) and spent most of the two-minute separation in locomotion along the front of the stall but with considerable individual variability. Differences in the time individual foals spent in locomotion were also repeatable from the first separation test to the last ( $R = 0.30$ , CI 95% = [0.09, 0.51],  $P = .003$ ). Plots for each of the five behavioral measures across T1–T4 are given in Supplementary Material 1.

In summary, we found consistent individual differences among foals during maternal separation in vocalization rate, time with tail raised (although weaker), and time spent in locomotion, but not in alertness or rate of head tosses.

#### 3.2. Repeatability of HRV measures

Separation from the mother resulted in considerable physiological changes for most analyzed variables already by postnatal day 7 (T1). Descriptive values for HRV variables across the four ages are shown in Table 4. Change from baseline to separation showed consistent individual differences across all ages in mean R-R interval – which is equivalent to change in HR – (ICC:  $R = 0.47$ , CI 95% = [0.25, 0.69],  $P = .001$ ) as well as in STDRR ( $R = 0.23$ , CI 95% = [0.01, 0.45],  $P = .03$ ) and RMSSD ( $R = 0.35$ , CI 95% = [0.13, 0.56],  $P = .001$ ). We did not find stable individual differences for the LF / HF ratio ( $R = 0.13$ , CI 95% = [0, 0.36],  $P = .10$ ). Plots for each of the four HRV measures across T1–T4 are given in Supplementary Material 2.

Changes in HRV values of individual foals from separation to reunion were less repeatable than changes from baseline to separation. Only in the recovery of heart rate (mean R-R interval) did we find stable individual differences across the four ages tested (mean R-R:  $R = 0.22$ , CI 95% = [0.01, 0.41],  $P = .02$ , STDRR:  $R = 0.07$ , CI 95% = [0, 0.353],  $P = .29$ , RMSSD:  $R = 0.14$ , CI95% = [0, 0.21],  $P = .45$ , LF / HF:  $R = 0.05$ , CI 95% = [0, 0.238],  $P = .72$ ).

In summary, we found consistent individual differences among foals during maternal separation across the four ages tested for changes in R-R, in STDRR and in RMSSD, but not for LF / HF. Individual differences among foals in changes in HRV values from separation to reunion with the mother were less clear and only significant for R-R.

#### 3.3. Correlation between behavioral and physiological measures

For dimension reduction purposes, for each of the age classes we performed a PCA for the three behavioral (vocalization, tail raised, locomotion) and a PCA for the three HRV (mean RR, STDRR, RMSSD)

**Table 4**

Mean  $\pm$  SD of the heart rate variability measures during maternal separation and their percent change (in brackets) from baseline to separation. T1 = 6.5  $\pm$  2.7 days old; T2 = 47.5  $\pm$  6.6; T3 = 126.9  $\pm$  7.2 days old; T4 = 182.2  $\pm$  8.9 days old.

Physiological variable	T1	T2	T3	T4
Mean HR (#/min)	167.4 $\pm$ 27.8 (52.9 $\pm$ 40.5)	187.1 $\pm$ 27.0 (116.3 $\pm$ 49.0)	177.4 $\pm$ 40.3 (163.5 $\pm$ 54.2)	171.3 $\pm$ 37.6 (154.0 $\pm$ 67.3)
Mean R-R (ms)	369.5 $\pm$ 87.3 (-31.3 $\pm$ 13.6)	331.2 $\pm$ 78.9 (-51.4 $\pm$ 11.1)	348.8 $\pm$ 66.9 (-60.4 $\pm$ 8.8)	374.6 $\pm$ 71.6 (-58.7 $\pm$ 9.7)
STDRR (ms)	42.9 $\pm$ 23.4 (28.6 $\pm$ 81.4)	33.2 $\pm$ 16.0 (-19.2 $\pm$ 43.9)	47.2 $\pm$ 29.7 (0.55 $\pm$ 60.8)	52.5 $\pm$ 32.5 (12.6 $\pm$ 92.3)
RMSSD (ms)	9.0 $\pm$ 4.3 (3.86 $\pm$ 52.1)	6.6 $\pm$ 2.9 (-56.9 $\pm$ 22.0)	10.4 $\pm$ 10.4 (-57.1 $\pm$ 20.7)	9.6 $\pm$ 6.7 (-56.7 $\pm$ 18.1)
LF / HF	8.6 $\pm$ 7.2 (26.3 $\pm$ 110.5)	7.2 $\pm$ 6.3 (72.2 $\pm$ 214.3)	6.7 $\pm$ 5.0 (74.5 $\pm$ 188.0)	8.3 $\pm$ 5.8 (32.5 $\pm$ 111.4)

variables that showed stable individual differences. In the case of the HRV variables the Eigenvalues of the first principal components ( $PC_{hrv1}$ ) were always close to or above 2.0 for all ages, accounting for 71.2  $\pm$  4.8% of all variance. In addition, all three variables' contribution was close to or higher than 0.8, with their highest loadings always in  $PC_{hrv1}$ . In contrast, the second principal components had Eigenvalues below 0.7, accounting on average for 19.2  $\pm$  4.0% of total variance (Supplementary Material 3a). We concluded that the first principal component ( $PC_{hrv1}$ ) describes well the physiological changes from baseline to separation and can be used for further analyses instead of the separate HRV variables.

In the case of the behavioral variables, differences were not so distinct between the principal components. Eigenvalues of the first principal components was only 1.57  $\pm$  4.3, on average accounting for 52.5  $\pm$  4.3% of all variance, while the second principal components sometimes had Eigenvalues close to 1, variance 28.6  $\pm$  2.2%. The third principal components even had Eigenvalues close to 0.6 in two instances (T1, T3) (Supplementary Material 3b). Thus, as behavioral variables did not always have their highest loading on the first principal component, we decided to use  $PC_{hrv1}$  and each of the three behavioral variables in the subsequent analyses.

Two out of the three correlations between the PC-scores for the physiological traits ( $PC_{hrv1}$ ) and behavioral variables (vocalization rate and locomotion) were significant at the phenotypic level. Both correlations were negative, meaning larger change in HRV from baseline to separation (greater change is reflected by lower values in change of mean R-R, STDRR and RMSSD) corresponded to more pronounced behavioral responses. The significant phenotypic correlations between HRV, vocalization rate and locomotion were primarily driven by between-individual correlations and not within-individual correlations (Table 5), which indicates that the relationship among them was due to an association between individuals' averages rather than to change in one trait being matched by change in another.

#### 3.4. Influence of mothers' vocalizations

Since it was not possible to completely separate the foals sensorially

from the mothers, and vocal communication still occurred during the separation period it is possible that the mothers' calls influenced the response of their young. We have included the mothers' vocalization rate in the models of repeatability so as to investigate further the influence of mothers' vocalizations on their foals' behavior and HRV. We used repeated measures correlations between the number of vocalizations the mothers emitted across the four tests and all measured variables of their foals ( $N = 30$  mothers and their foals). We found a significant association between the number of vocalizations by mothers and their foals ( $r_{rm} = 0.31$ ,  $P = .004$ ), but no evidence for any of the other variables that mothers' vocalizations in response to separation influenced the degree of foals' behavioral or physiological reactions (alertness:  $r_{rm} = 0.17$ ,  $P = .13$ ; time tail raised:  $r_{rm} = 0.11$ ,  $P = .33$ ; head tosses:  $r_{rm} = -0.10$ ,  $P = .41$ ; locomotion:  $r_{rm} = 0.22$ ,  $P = .08$ ; change in mean R-R:  $r_{rm} = 0.22$ ,  $P = .17$ ; change in STDRR:  $r_{rm} = 0.05$ ,  $P = .65$ ; change in RMSSD:  $r_{rm} = 0.07$ ,  $P = .52$ ; change in LF/HF:  $r_{rm} = -0.15$ ,  $P = .29$ ). A more detailed analysis of the dyads' vocalizations revealed that both parties' vocalizations decreased with foals' age (RM-ANOVA: foals  $F_{3,87} = 21.9$ ,  $P < .001$ ; mares  $F_{3,87} = 19.41$ ,  $P < .001$ ), and that foals vocalized significantly more than their mother at every age (Wilcoxon matched pairs tests: T1: foals 35.8  $\pm$  13.4; mares 27.3  $\pm$  13.7;  $z = 2.65$ ,  $P = .008$ ; T2: foals 29.2  $\pm$  12.4; mares 22.7  $\pm$  10.7;  $z = 2.33$ ,  $P = .02$ ; T3: foals 22.59  $\pm$  12.2; mares 16.9  $\pm$  9.9;  $z = 2.47$ ;  $P = .01$ ; T4: foals 17.9  $\pm$  9.2; mares 13.1  $\pm$  10.9;  $z = 2.35$ ,  $P = .02$ ).

#### 4. Discussion

The results clearly show the existence of consistent individual differences in behavioral and physiological phenotype in response to the stress of brief maternal separation across the six-month preweaning period in foals of the domestic horse. Differences were particularly clear for the three time-domain measures of the HRV (change in mean R-R, STDRR, RMSSD), which as shown by PCA, were also well correlated. Stable individual differences were not found, however, for the frequency domain variable, the change in LF/HF. To measure this we had to follow the recommended presets for foals given by von Borell et al.

**Table 5**

Correlations between scores in  $PC_{hrv1}$  and the behavioral variables showing stable individual differences at the a) phenotypic level, b) between-individual level, and c) within-individual level. For all traits, the sample size was 4 measurements from 30 foals. Bolded values denote correlations where 95% confidence intervals (in parentheses) did not include zero. Asterisks indicate significance levels at  $P < .05$  \*,  $P < .01$  \*\*,  $P < .001$  \*\*\*.

	a) Phenotypic correlations	b) Between-individual correlations	c) Within-individual correlations
Vocalization	$PC_{hrv1}$ <b>-0.363</b> CI [-0.506, -0.199] *	$PC_{hrv1}$ <b>-0.559</b> CI [-0.742, -0.300] ***	$PC_{hrv1}$ <b>-0.196</b> CI [-0.368, -0.011]
Tail raised	-0.181 CI [-0.357, 0.007]	-0.359 CI [-0.667, 0.053] *	-0.068 CI [-0.256, 0.125]
Locomotion	<b>-0.341</b> CI [-0.479, -0.185] *	<b>-0.608</b> CI [-0.793, -0.319] ***	<b>-0.200</b> CI [-0.371, -0.016]

[84] even though these are for six-month old foals or older, as to our knowledge no such information is available for the younger ages tested in our study. Thus, our results for the analysis of this variable may be inconclusive due to the use of inappropriate high and low frequency settings. This is a problem widely discussed in the literature given the lack of precise information for horses of different ages (e.g. Stucke et al. [74]; McDuffee et al. [51]).

Three of the behavioral measures tested (vocalization rate, tail raised, locomotion) also showed consistent individual differences, although not as clearly correlated with each other as the three HRV variables mentioned above. Vocalization rate showed the most consistent individual differences across all four ages and although the rate declined with the approach of weaning, relative differences among foals were maintained (cf. [72]). The decline in the rate of separation calls with age is consistent with the previous findings of Houpt [37] and Lansade et al. [48] in foals, and of Bánszegi et al. [4] in kittens of the domestic cat. This seems unlikely to have been due to learning or habituation to the test situation given the interval of several weeks between test sessions, and given that the similar decline in separation calls reported for kittens was shown even by control animals tested just once at the oldest age [4]. The neural control of vocalization is closely integrated with and is considered a good indicator of the emotional state of an individual (reviews in Jürgens [40]; Briefer [10]), and previous studies using similar social separation paradigms have found consistent individual differences in this in a variety of other mammals also, e.g. in cattle [9,36], in sheep and goats [5,57,61], in pigs [49], in mice and cats [38,39,79] as well as in the horse [48].

Consistent individual differences in the three behavioral measures showing greatest consistency were supported by the significant correlation of these, particularly vocalization rate and locomotion, with the principal component derived from the three main HRV measures (Table 5), indicating that the behavioral measures can be taken to indicate different levels of arousal, i.e. foals showing more pronounced stress-related behaviors also showed lower parasympathetic and/or higher sympathetic activation. These findings are consistent with previous reports that behaviorally more reactive horses have higher HR, shorter R-R intervals, and lower STDRR and RMSSD values [2,56,83,84].

Physiological variables measured in real time in parallel with behavioral measures can be an important aid in interpreting individual differences in behavioral performance and in overcoming the problem that animals may respond to the same test situation with similar behaviors but for different reasons (e.g. low levels of locomotion in an open field test may be due to fear or lack of motivation to explore), or show different behaviors for the same reason (e.g. “freezing” from fear or moving around vigorously in panic) (e.g. Reyes-Meza et al. [65]).

Nevertheless, the strong consistency of individual differences in vocalization rate during brief maternal separation from the earliest age tested here, the ease with which this can be scored even by hand, and the close association with HRV values indicative of level of arousal, often referred to as “temperament” in the horse (e.g. [28,47,48]), suggest that this may provide an efficient and practical means of selecting individuals most suited to particular applied contexts [15,31,58].

Our findings, however, contrast with those of the only other study to date of individual differences in behavior in preweaning age foals [47]. In that study the authors failed to find consistent individual differences. One reason for this difference might be that we purposely chose to test foals in a situation of clear biological relevance and one likely to be stressful, albeit to different degrees, for all individuals. This was indeed indicated by all foals showing high, “ceiling” levels of alertness. Thus, particularly when testing young animals over a period of considerable developmental change it is recommendable to use stimuli or contexts of clear biological significance and corresponding as closely as possible to the evolved responses of animals to real life situations (cf. González et al. [32] in kittens of the domestic cat).

Evidence for such consistent differences in individual behavioral and physiological phenotype raises the question of their origin. There are several, not mutually exclusive, possibilities; genetic or experiential [26,27,70,77,80], perhaps including the influence of the mothers' behavior in response to the stress of everyday events, or a combination of these. Although it was not possible in the present study to identify the contribution of such factors to the individual differences found here, this does not affect the main finding of our study that consistent individual difference exist among foals of the domestic horse, and across a substantial period of early development.

Despite the evidence for consistent individual differences in behavioral and physiological phenotype found in the present study, an important remaining question is whether these extend beyond weaning and into juvenile and adult life? We are presently investigating this by repeatedly testing the same 30 foals from weaning until one year of age.

## 5. Conclusions

According to the results of the present study, foals of the domestic horse show consistent individual differences in behavioral and physiological phenotype across the first six months of postnatal development in response to the stress of brief maternal separation. Such tests of clear biological relevance may be particularly suitable for identifying such differences, and even from an early age. They may thus provide an efficient and practical means of selecting individuals most suited to particular applied contexts. Nevertheless, it remains to be investigated whether the individual differences identified here persist beyond weaning and into adult life.

## Acknowledgements and funding

The study was conducted in partial fulfillment of the doctoral requirements of the first author within the postgraduate program of Sciences in Animal Production and Health, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank the Metropolitan Mounted Police Unit of Mexico City for allowing us access to their facilities and horses, and the veterinarian personnel, especially Dr. Eduardo Morones, for vital support throughout the study. We also thank the several students who helped with the experiments during the study, especially to Aide Gómez Zarco and Adriana García Ramírez (author of Fig. 1). Thanks also to Carolina Rojas for administrative support. Special thanks go to Mr. Alfonso Aguilar for providing the HRV measurement equipment. Funding was provided by CONACyT, México, doctoral scholarship No. 227352 to the first author, and by the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA project No. IN212416, and Instituto de Investigaciones Biomédicas). The funding agencies did not influence the conduct of the research in any way.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112652>.

## References

- [1] B.M. Appelhans, L.J. Luecken, Heart rate variability as an index of regulated emotional responding, *Rev. Gen. Psychol.* 10 (2006) 229–240, <https://doi.org/10.1037/1089-2680.10.3.229>.
- [2] I. Bachmann, P. Bernasconi, R. Herrmann, M.A. Weishaupt, M. Stauffacher, Behavioural and physiological responses to an acute stressor in crib-biting and control horses, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 82 (2003) 297–311, [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00086-8).
- [3] J.Z. Bakdash, L.R. Marusich, Repeated measures correlation, *Front. Psychol.* 8





- <https://doi.org/10.1136/vr.154.22.687>.
- [61] E.O. Price, J. Thos, Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats, *Appl. Anim. Ethol.* 6 (1980) 331–339, [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(80\)90133-9](https://doi.org/10.1016/0304-3762(80)90133-9).
- [62] R Core Team, R: A language and environment for statistical computing 3.4.1 Vienna, (2017) (Austria).
- [63] D. Réale, N.J. Dingemanse, A.J.N. Kazem, J. Wright, Evolutionary and ecological approaches to the study of personality, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365 (2010) 3937–3946, <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0222>.
- [64] K.A. Reid, C.W. Rogers, G. Gronqvist, E.K. Gee, C.F. Bolwell, Anxiety and pain in horses measured by heart rate variability and behavior, *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 22 (2017) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.09.002>.
- [65] V. Reyes-Meza, R. Hudson, M. Martínez-Gómez, L. Nicolás, H.G. Rödel, A. Bautista, Possible contribution of position in the litter huddle to long-term differences in behavioral style in the domestic rabbit, *Physiol. Behav.* 104 (2011) 778–785, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.07.019>.
- [66] T.R. Rietmann, A.E.A. Stuart, P. Bernasconi, M. Stauffacher, J.A. Auer, M.A. Weishaupt, Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 88 (2004) 121–136, <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.016>.
- [67] A. Safryghin, D.V. Hebesberger, C.A.F. Wascher, Testing for behavioural and physiological responses of domestic horses (*Equus caballus*) across different contexts - consistency over time and effects of context, *Front. Psychol.* 10 (2019) 849, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00849>.
- [68] A. Schmidt, E. Möstl, C. Wehnert, J. Aurich, J. Müller, C. Aurich, Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport, *Horm. Behav.* 57 (2010) 209–215, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.11.003>.
- [69] A. Sih, A. Bell, J.C. Johnson, Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview, *Trends Ecol. Evol.* 19 (2004) 372–378, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.04.009>.
- [70] A. Sih, K.J. Mathot, M. Moirón, P.-O. Montiglio, M. Wolf, N.J. Dingemanse, Animal personality and state-behaviour feedbacks: a review and guide for empiricists, *Trends Ecol. Evol.* 30 (2015) 50–60, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.004>.
- [71] J.A. Stamps, P.A. Biro, Personality and individual differences in plasticity, *Curr. Opin. Behav. Sci.* 12 (2016) 18–23, <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.08.008>.
- [72] J.A. Stamps, T.G.G. Groothuis, The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives, *Biol. Rev.* 85 (2010) 301–325, <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00103.x>.
- [73] M.A. Stoffel, S. Nakagawa, H. Schielzeth, rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models, *Methods Ecol. Evol.* 8 (2017) 1639–1644, <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12797>.
- [74] D. Stucke, M.G. Ruse, D. Lebelt, Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity - pros and cons of different methods, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 166 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.02.007>.
- [75] M.P. Tarvainen, J.P. Niskanen, J.A. Lipponen, P.O. Ranta-aho, P.A. Karjalainen, Kubios HRV – heart rate variability analysis software, *Comput. Methods Prog. Biomed.* 113 (2014) 210–220, <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2013.07.024>.
- [76] F. Trillmich, A. Günther, C. Müller, K. Reinhold, N. Sachser, New perspectives in behavioural development: adaptive shaping of behaviour over a lifetime? *Front. Zool.* 12 (2015), <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S1>.
- [77] F. Trillmich, R. Hudson, The emergence of personality in animals: the need for a developmental approach, *Dev. Psychobiol.* 53 (2011) 505–509, <https://doi.org/10.1002/dev.20573>.
- [78] S.J. Tyler, The behaviour and social organization of the New Forest Ponies, *Anim. Behav. Monogr.* 5 (1972) 87–196, [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(72\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(72)90003-6).
- [79] A. Urrutia, S. Martínez-Byer, P. Szenczi, R. Hudson, O. Bánszegi, Stable individual differences in vocalisation and motor activity during acute stress in the domestic cat, *Behav. Process.* 165 (2019) 58–65, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.022>.
- [80] K. van Oers, J.C. Mueller, Evolutionary genomics of animal personality, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365 (2010) 3991–4000, <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0178>.
- [81] E. van Vollenhoven, C.C. Grant, L. Fletcher, A. Ganswindt, P.C. Page, Repeatability and reliability of heart rate variability in healthy, adult pony mares, *J. Equine Vet. Sci.* 46 (2016) 73–81, <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.07.006>.
- [82] E.K. Visser, C.G. van Reenen, M. Rundgren, M. Zetterqvist, K. Morgan, H.J. Blokhuis, Responses of horses in behavioural tests correlate with temperament assessed by riders, *Equine Vet. J.* 35 (2003) 176–183, <https://doi.org/10.2746/042516403776114108>.
- [83] E.K. Visser, C.G. van Reenen, J.T.N. van der Werf, M.B.H. Schilder, J.H. Knaap, A. Barneveld, H.J. Blokhuis, Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses, *Physiol. Behav.* 76 (2002) 289–296, [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00698-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00698-4).
- [84] E. von Borell, et al., 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 (2007) 293–316, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.01.007>.
- [85] U.K. von Borstel, S. Pasing, M. Gaulty, Towards a more objective assessment of equine personality using behavioural and physiological observations from performance test training, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135 (2011) 277–285, <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.007>.
- [86] J.M. Watts, J.M. Stookey, S.M. Schmutz, C.S. Waltz, Variability in vocal and behavioural responses to visual isolation between full-sibling families of beef calves, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 70 (2001) 255–273, [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00163-5).
- [87] M. Wolf, F.J. Weissing, Animal personalities: consequences for ecology and evolution, *Trends Ecol. Evol.* 27 (2012) 452–461, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.001>.
- [88] A. Wolff, M. Hausberger, N. Le Sclan, Experimental tests to assess emotionality in horses, *Behav. Process.* 40 (1997) 209–221, [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(97\)00784-5](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(97)00784-5).

## **7. Segundo artículo, en revisión**

### *Diferencias individuales en comportamiento y fisiología de caballos juveniles desde edad temprana*

#### **Resumen**

La mayoría de la gente que vive o trabaja directamente con animales están familiarizados con la existencia de diferencias individuales en su comportamiento; igualmente, está creciendo la noción de que un mejor entendimiento de dichas diferencias individuales puede contribuir a mejoras en el manejo, producción y bienestar animal. Dadas las dificultades logísticas y financieras para realizar estudios longitudinales, particularmente en especies mamíferas grandes y de desarrollo lento, como es el caso de una buena parte de animales domésticos, aún existe poca información sobre a qué edad, en la juventud y/o infancia emergen dichas diferencias y si persisten a lo largo de etapas del desarrollo. Como continuación de un trabajo previo de la respuesta conductual y fisiológica (variabilidad de frecuencia cardíaca, VaFc) de 30 potros raza Azteca de ambos sexos, ante breves separaciones maternas desde el nacimiento hasta el destete, realizamos pruebas de separación social en los mismos animales post-destete en dos ocasiones más, esta vez a los nueve meses y al año de edad, registrando las mismas variables fisiológicas y conductuales que en el primer estudio. Igual que en el primer trabajo, hallamos estabilidad en las diferencias individuales en variables conductuales (más notablemente en la tasa de vocalizaciones, duración de locomoción y de la cola levantada), igualmente en tres de las cuatro variables de VaFc para ambas edades. Contrastando al primer estudio, no encontramos una asociación entre los parámetros conductuales y fisiológicos en edad juvenil. Concluimos que hay estabilidad considerable en las diferencias individuales

conductuales y fisiológicas en respuesta a un estresor breve y relevantemente ecológico a lo largo del desarrollo temprano del caballo doméstico, y que estas diferencias pueden ser indicadores confiables para su uso en posteriores contextos aplicados.

Manuscript Number:

Title: Repeatable individual differences in behaviour and physiology in juvenile horses from an early age

Article Type: Research Paper

Keywords: Individual differences; Temperament; Development; Equus caballus; Social separation; Heart rate variability

Corresponding Author: Dr. Péter Szenczi,

Corresponding Author's Institution: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

First Author: Lucía Pérez Manrique

Order of Authors: Lucía Pérez Manrique; Oxána Bánszegi; Robyn Hudson; Péter Szenczi

Abstract: Most people living or working in close association with animals are familiar with individual differences in their behaviour, and awareness is growing that understanding such differences can contribute to improved management, production and welfare. Nevertheless, due to the considerable logistic and financial difficulties of conducting longitudinal studies, particularly in the large, slow-growing mammalian species comprising an important part of the world's domestic animals, there is still little information on how early such differences emerge and whether they persist across different developmental stages. In an extension of a previous study of the behavioural and physiological (heart rate variability, HRV) response of 30 Azteca-breed foals of both sexes to repeated brief maternal separation from birth to weaning, we tested the same animals post-weaning in two tests of brief separation from their social group when they were approximately nine months and one year old, and recording the same behavioural and physiological variables as previously. As in the earlier study, we found stable individual differences in several behavioural variables (most notably vocalization rate, duration of locomotion and duration of high tail carriage), and in three of the four HRV measures at the two ages. These corresponded to the individual differences we had found pre-weaning. But in contrast to our previous study, we no longer found an association between the behavioural and physiological measurements at this later age. We conclude that there is considerable stability in individual differences in behaviour and physiology in response to a brief and ecologically relevant stressor across early development in the horse, and that these differences might be reliable indicators of individuals' suitability for later use in particular applied contexts.

## Track your recent Co-Authored submission to APPLAN Inbox x



**Applied Animal Behaviour Science** <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
to me ▾

Wed, May 13, 3:40 PM   

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Lucía Pérez Manrique,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Applied Animal Behaviour Science

Title: Repeatable individual differences in behaviour and physiology in juvenile horses from an early age

Corresponding Author: Péter Szenczi

Co-Authors: Lucía Pérez Manrique; Oxána Bánszegi; Robyn Hudson;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/applan/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Lucía&lname=Pérez Manrique&email=mvzlucia@gmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/applan/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=mvzlucia@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at [peter.szenczi@gmail.com](mailto:peter.szenczi@gmail.com).

Thank you,

Applied Animal Behaviour Science

## **8. Discusión general y conclusiones**

Los resultados de este estudio arrojaron evidencia de la existencia de diferencias individuales en la conducta y fisiología del caballo doméstico en etapas tempranas del desarrollo. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que logra demostrar su existencia, así como la correlación entre ambos parámetros. En un primer intento, el estudio de Lansade et al. (2007), realizado también en potros jóvenes no encontraron estabilidad conductual intraindividual, muy probablemente por fallos metodológicos, destacando así la gran relevancia que tiene el diseño y selección de pruebas biológicamente relevantes para la especie con que se esté trabajando. En este sentido, existen hallazgos sobre la existencia de diferencias individuales consistentes en pruebas de separación social en otras especies altamente gregarias, también a edades tempranas como bovinos (Boissy y Bouissou, 1995), borregos y cabras (Price y Thos, 1980; Barnard et al., 2015; Nawroth et al., 2017), y cerdos (Leliveld et al., 2017).

Probablemente, considerando que el caballo doméstico es una especie altamente reactiva ante situaciones amenazantes, los esfuerzos para encontrar mediciones y pruebas de temperamento se ha centrado en evaluarlos durante situaciones generadoras de respuestas de miedo; sin embargo, el procedimiento de exposición de los caballos a estos escenarios resulta en conductas de difícil interpretación, ambiguas, poco objetivas y bajo esquemas no naturales; por ejemplo, la respuesta que tenga un animal ante la presencia de un objeto novedoso y/o en un ambiente también nuevo, puede confundirse con estar separado o restringido durante dicha exposición; igualmente, la ausencia de respuesta puede ser interpretada tanto como congelamiento por miedo, o también pueden ser falta de interés en el objeto). Estas observaciones han llevado a un consenso general en la necesidad de diseñar pruebas que faciliten la interpretación, ejecución y resultados más claros, (Seaman et al., 2002; Forkman et al., 2007; von Borstel et al., 2013), para lo cual es fundamental

considerar el valor etológico de las pruebas y conductas en relación a la especie como lo es la separación social, misma que para el caballo es sumamente estresante a lo largo de toda su vida, no solo en etapas tempranas del desarrollo.

Resulta ideal que los hallazgos conductuales busquen relación y se sustenten con parámetros fisiológicos, que en este caso fueron de relativo fácil acceso, no invasivos, confiables y de medición continua como la variabilidad de frecuencia cardiaca (Kuwahara et al., 1996; von Borell et al., 2007; Ellis et al., 2014; Stucke et al., 2015), que además está validada para su uso en caballos (von Borell et al., 2007; Ille et al., 2014). Al respecto, resulta notable que en el presente estudio se haya dado no solo consistencia individual en parámetros conductuales (vocalizaciones, locomoción y mantener la cola elevada) y en la variabilidad de frecuencia cardiaca, sino que estuvieran correlacionadas. Esto posibilita deducir que un individuo que vocaliza más, se mueve más y mantiene la cola elevada tiene dominio simpático, siendo probablemente más “reactivo”. De forma práctica, si no se tiene acceso a la tecnología para la medición de VaFc, pueden realizarse estas pruebas de separación social breve por el personal de cada instalación considerando solo mediciones conductuales en individuos jóvenes, idealmente después del mes de edad, según hallazgos de los resultados del presente estudio (correlación con valores fisiológicos consistentes a partir de la P2, al 1.5 mes de edad y hasta los seis meses de edad, P4).

Es interesante continuar con investigaciones referentes a que las variables conductuales mantuvieron su estabilidad intraindividual y variación interindividual hasta el año de edad, pero la correlación con VaFc se perdió a partir de los 9 meses de edad. Cabe señalar que siendo el caballo altamente gregario en cualquier etapa de su vida, y que las variables conductuales se mantuvieron estables entre sí durante todo el estudio, al igual que la VaFc a lo largo del año de edad, las pruebas

de separación materna y social representan una herramienta valiosa para la caracterización de temperamentos en un futuro. De forma inmediata, con la población experimental (que actualmente tiene 3.5 años de edad), sería valiosa la validación de los resultados mediante la realización de cuestionarios al personal que los maneja cotidianamente en la UPM-Montada (ej. entrenadores, médicos veterinarios, herreros, jinetes).

Falta investigar aún a qué se debe la pérdida de relación entre los parámetros conductuales y fisiológicos en las últimas dos pruebas. Conforme se ha visto en otras especies, esto puede responder a plasticidad o flexibilidad conductual en las diferencias individuales (Forsman, 2015; Trillmich et al., 2015; Stamps y Biro, 2016) determinada por varios factores que, teniendo una población con manejo homogéneo (como la presente) y perenne, ayudaría a aportar información sobre los mecanismos que determinan el temperamento animal. Para esto, se requieren realizar estudios con esta misma metodología a partir del año de edad y buscar si las diferencias individuales en el comportamiento y fisiología vuelven a correlacionarse en algún momento, así como la supervivencia de ésta correlación durante cambios que sufran en etapa adulta (ej. castración, maternidad, eventos traumáticos). Con fines prácticos, queda también pendiente realizar más investigación sobre las necesidades específicas para cada función zootécnica, es decir, determinar objetivamente qué características determinan (por ejemplo) a un animal de terapia ideal, versus a un caballo policía o de carreras. Una vez que esto se estudie (la duración y cambios de diferencias individuales en caballos), así como los perfiles idóneos para distintos fines zootécnicos, podrían seleccionarse animales desde jóvenes para actividades diversas contribuyendo así, a la seguridad del humano y al bienestar de los animales.



## 9. Literatura citada

- Anderson, M.K., Friend, T.H., Evans, J.W., Bushong, D.M., 1999. Behavioral assessment of horses in therapeutic riding programs. *Applied Animal Behaviour Science* 63, 11-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00237-8)
- Applehans, B.M., Luecken, L.J., 2006. Attentional processes, anxiety, and the regulation of cortisol reactivity. *Anxiety, Stress and Coping* 19, 81-92. <https://doi.org/10.1080/10615800600565724>
- Bánszegi, O., Szenczi, P., Urrutia, A., Hudson, R., 2017. Conflict or consensus? Synchronous change in mother-young vocal communication across weaning in the cat. *Animal Behaviour* 130, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.025>
- Barnard, S., Matthews, L.R., Messori, S., Vulpiani, M.P., Ferri, N., 2015. Behavioural reactivity of ewes and lambs during partial and total social isolation. *Applied Animal Behaviour Science* 163, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.11.016>
- Beekman, M., Jordan, L.A., 2017. Does the field of animal personality provide any new insights for behavioral ecology? *Behavioral Ecology* 28, 617-623. <https://doi.org/10.1093/beheco/ax022>
- Bell, A.M., Hankison, S.J., Laskowski, K.L., 2009. The repeatability of behaviour: a meta-analysis. *Animal Behaviour* 77, 771-783. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.12.022>
- Bell, A.M., 2017. There is no special sauce: a comment on Beekman and Jordan. *Behavioral Ecology* 28, 626-627. <https://doi.org/10.1093/beheco/ax031>
- Berger, J., 1977. Organizational systems and dominance in feral horses in the Grand Canyon. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 131-146.
- Boissy, A., Bouissou, M.F., 1995. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science* 46, 17-31. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00633-8](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00633-8)
- Boissy, A., Fisher, A.D., Bouix, J., Hinch, G.N., Le Neindre, P.L., 2005. Genetics of fear in ruminant livestock. *Livestock Production Science* 93, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.11.003>
- Boissy, A., Erhard, H.W., 2014. How studying interactions between animal emotions, cognition, and personality can contribute to improve farm animal welfare., in: Grandin, T., Deesing, M.J. (Eds.), *Genetics and the behavior of domestic animals*, Elsevier, USA, pp. 81-113.
- Brousset, D., Galindo, F., Valdez, P., Romano, M., Schuneman, A., 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Veterinaria México* 36, 325-337.
- Buss, D.M., 1995. Evolutionary psychology: A new paradigm for psychological science. *Psychological Inquiry* 6, 1-30. [https://doi.org/10.1207/s15327965pli0601\\_1](https://doi.org/10.1207/s15327965pli0601_1)
- Carlson, B.E., Tetzlaff, S.J., 2020. Long - term behavioral repeatability in wild adult and captive juvenile turtles (*Terrapene carolina*): Implications for personality development. *Ethology* 126, 668-678. <https://doi.org/10.1111/eth.13024>

- Carter, A.J., Feeney, W.E., Marshall, H.H., Cowlshaw, G., Heinsohn, R., 2013. Animal personality: what are behavioural ecologists measuring? *Biological Reviews* 88, 465-475. <https://doi.org/10.1111/brv.12007>
- Caspi, A., Roberts, B.W., Shiner, R.L., 2005. Personality development: Stability and change. *Annual Review of Psychology* 56, 453-484. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.141913>
- Cavigelli, S.A., 2005. Animal personality and health. *Behaviour* 42, 1223-1244. <https://doi.org/10.1163/156853905774539355>
- Christenfeld, N., Gerin, W., 2000. Social support and cardiovascular reactivity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 54, 251-257. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(00\)80067-0](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(00)80067-0)
- Christensen, J.W., Ladewig, J., Søndergaard, E., Malmkvist, J., 2002. Effects of individual versus group stabling on social behaviour in domestic stallions. *Applied Animal Behaviour Science* 75, 233-248. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00196-4)
- Christensen, J.W., Søndergaard, E., Thodberg, K., Halekoh, U., 2011. Effects of repeated regrouping on horse behaviour and injuries. *Applied Animal Behaviour Science* 133, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.05.013>
- Cohen, S., Wills, T.A., 1985. Stress, social support, and the buffering hypothesis. *Psychological Bulletin* 98, 310. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.98.2.310>
- Cook, W.R., 2003. Bit-induced pain: a cause of fear, flight, fight and facial neuralgia in the horse. *Pferdeheilkunde* 19, 75-82. <https://doi.org/10.21836/PEM20030111>
- Crowell-Davis, S.L., 1985. Nursing behaviour and maternal aggression among Welsh ponies (*Equus caballus*). *Applied Animal Behaviour Science* 14, 11-25. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(85\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0168-1591(85)90034-6)
- Crowell-Davis, S.L., Houpt, K.A., Carnevale, J., 1985. Feeding and drinking behavior of mares and foals with free access to pasture and water. *Journal of Animal Science* 60, 883-889. <https://doi.org/10.2527/jas1985.604883x>
- Dalke, K.K., Hunt, M.J.O., 2017. Mustangs and domestic horses: Examining what we think we know about differences. *Humanimalia: A Journal of Human/Animal Interface Studies* 8, 46-62.
- Dalla Costa, E., Dai, F., Murray, L.A.M., Guazzetti, S., Canali, E., Minero, M., 2015. A study on validity and reliability of on-farm tests to measure human-animal relationship in horses and donkeys. *Applied Animal Behaviour Science* 163, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.12.007>
- Deesing, M.J., Grandin, T., 2014. Behavior genetics of the horse (*Equus caballus*), in: Grandin, T., Deesing, M.J. (Eds.), *Genetics and the behavior of domestic animals*, Elsevier, USA, pp. 237-290.
- Diamond, J., 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418, 700-707. <https://doi.org/10.1038/nature01019>
- Dingemanse, N.J., Kazem, A.J., Réale, D., Wright, J., 2010. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.013>
- Dogan, K.H., Demirci, S., 2012. Livestock-handling related injuries and deaths, in: Javed, K. (Ed.), *Livestock production*, InTech, New York, pp. 81-116.

- Dosmann, A.J., Brooks, K.C., Mateo, J.M., 2015. Within-individual correlations reveal link between a behavioral syndrome, condition, and cortisol in free-ranging Belding's ground squirrels. *Ethology* 121, 125-134. <https://doi.org/10.1111/eth.12320>.
- Elizondo, C., Vargas Roa, M., 1989. Virtudes y características del caballo Azteca, in: Elizondo, C. (Ed.), *El caballo de raza Azteca*, Edamex, México, pp. 61-70
- Ellis, A.D., Stephenson, M., Preece, M., Harris, P., 2014. A novel approach to systematically compare behavioural patterns between and within groups of horses. *Applied Animal Behaviour Science* 161, 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.09.017>
- Feist, J.D., McCullough, D.R., 1976. Behavior patterns and communication in feral horses. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 41, 337-371. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1976.tb00947.x>
- Finkemeier, M.-A., Langbein, J., Puppe, B., 2018. Personality research in mammalian farm animals: concepts, measures, and relationship to welfare. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 131-146. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00131>
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.C., Canali, E., Jones, R.B., 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior* 92, 340-374. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.016>
- Forsman, A., 2015. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity* 115, 276-284. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.92>
- Friend, T., 2000. Dehydration, stress, and water consumption of horses during long-distance commercial transport. *Journal of Animal Science* 78, 2568-2580. <https://doi.org/10.2527/2000.78102568x>
- Fureix, C., Jégo, P., Sankey, C., Hausberger, M., 2009. How horses (*Equus caballus*) see the world: humans as significant “objects”. *Animal Cognition* 12, 643-654. <https://doi.org/10.1007/s10071-009-0223-2>
- Fureix, C., Menguy, H., Hausberger, M., 2010. Partners with bad temper: reject or cure? A study of chronic pain and aggression in horses. *PLOS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012434>
- Garamszegi, L.Z., Markó, G., Herczeg, G., 2013. A meta-analysis of correlated behaviors with implications for behavioral syndromes: relationships between particular behavioral traits. *Behavioral Ecology* 24, 1068-1080. <https://doi.org/10.1093/beheco/art033>
- Gartner, M.C., Weiss, A., 2013. Personality in felids: A review. *Applied Animal Behaviour Science* 144, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.11.010>
- Gartner, M.C., 2015. Pet personality: A review. *Personality and individual differences* 75, 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.paid.2014.10.042>
- Gehrke, E.K., Baldwin, A., Schiltz, P.M., 2011. Heart rate variability in horses engaged in equine-assisted activities. *Journal of Equine Veterinary Science* 31, 78-84.
- Goddard, M., Beilharz, R., 1984. A factor analysis of fearfulness in potential guide dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 12, 253-265. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(84\)90118-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(84)90118-7)
- Goldberg, L.R., 1993. The structure of phenotypic personality traits. *American Psychologist* 48, 26-34.

- González, D., Szenczi, P., Bánszegi, O., Hudson, R., 2018. Testing aggressive behaviour in a feeding context: Importance of ethologically relevant stimuli. *Behavioural Processes* 150, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.02.011>
- Goodenough, J., McGuire, B., Jakob, E., 2009. Learning and cognition, in: Goodenough, J., McGuire, B., Jakob, E. (Eds.), *Perspectives on animal behavior*, John Wiley & Sons, EUA, p. 77-98.
- Górecka-Bruzda, A., Jaworski, Z., Suwała, M., Boroń, M., Ogłuszka, M., Earley, B., Sobczyńska, M., 2017. Longitudinal study on human-related behaviour in horses—Can horses (*Equus caballus*) be de-domesticated? *Applied Animal Behaviour Science* 195, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.05.020>
- Gosling, S.D., John, O.P., 1999. Personality dimensions in nonhuman animals: a cross-species review. *Current Directions in Psychological Science* 8, 69-75. <https://doi.org/10.1111/1467-8721.00017>
- Gosling, S.D., 2001. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin* 127, 45-86. <https://doi.org/10.037//0033-2909.127.1.45>
- Gosling, S.D., 2008. Personality in non - human animals. *Social and Personality Psychology Compass* 2, 985-1001. <https://doi.org/10.1111/j.1751-9004.2008.00087.x>
- Gosling, S.D., Harley, B.A., 2009. Animal models of personality and cross-species comparisons, in: P.J., C., Matthews, G. (Eds.), *The Cambridge handbook of personality psychology*, Cambridge University Press, New York, pp. 275-286.
- Grandin, T., 1993. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. *Applied Animal Behaviour Science* 36, 1-9. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90094-6)
- Grandin, T., 1998. Assessment of temperament in cattle and its effect on weight gain and meat quality and other recent research on hair whorls, coat color bone thickness, and fertility. *The Professional Animal Scientist* 4.
- Groothuis, T.G.G., Carere, C., 2005. Avian personalities: characterization and epigenesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29, 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.010>
- Groothuis, T.G.G., Trillmich, F., 2011. Unfolding personalities: the importance of studying ontogeny. *Developmental Psychobiology* 53, 641-655. <https://doi.org/10.1002/dev.201574>
- Hamlin, R.L., Klepinger, W.L., Gilpin, K.W., Smith, C.R., 1972. Autonomic control of heart rate in the horse. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 222, 976-978.
- Hartmann, E., Søndergaard, E., Keeling, L.J., 2012. Keeping horses in groups: A review. *Applied Animal Behaviour Science* 136, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.004>
- Hausberger, M., Bruderer, C., Le Scolan, N., Pierre, J.-S., 2004. Interplay between environmental and genetic factors in temperament/personality traits in horses (*Equus caballus*). *Journal of Comparative Psychology* 118, 434. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.118.4.434>

- Hausberger, M., Roche, H., Henry, S., Visser, E.K., 2008. A review of the human–horse relationship. *Applied Animal Behaviour Science* 109, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.04.015>
- Hayes, J.P., Jenkins, S.H., 1997. Individual variation in mammals. *Journal of Mammalogy* 78, 274-293. <https://doi.org/10.2307/1382882>
- Henry, S., Hemery, D., Richard, M.-A., Hausberger, M., 2005. Human–mare relationships and behaviour of foals toward humans. *Applied Animal Behaviour Science* 93, 341-362. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.01.008>
- Henry, S., Briefer, S., Richard - Yris, M.A., Hausberger, M., 2007. Are 6-month-old foals sensitive to dam's influence? *Developmental Psychobiology* 49, 514-521. <https://doi.org/10.1002/dev.20225>
- Henry, S., Zanella, A.J., Sankey, C., Richard-Yris, M.-A., Marko, A., Hausberger, M., 2012. Adults may be used to alleviate weaning stress in domestic foals (*Equus caballus*). *Physiology & Behavior* 106, 428-438. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.02.025>
- Hintz, H., 1995. Thoughts about the history of horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 15, 336-339. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(07\)80536-3](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(07)80536-3)
- Holbrook, C.T., Wright, C.M., Pruitt, J.N., 2014. Individual differences in personality and behavioural plasticity facilitate division of labour in social spider colonies. *Animal Behaviour* 97, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.09.015>
- Hopster, H., 1998. Short- and long-term consistency of behavioural and physiological stress responses in dairy cows during a novel environment test. Coping strategies in dairy cows, Chair Ethology, Wageningen Agricultural University, The Netherlands (PhD Thesis).
- Hopster, H., van der Werf, J.T.N., Coppelmans, A.M.L., Korte, S.M., van Reenen, C.G., Blokhuis, H.J., 1999. Objective measurements of fear in dairy cattle, Proceedings of the 33rd International Congress of the International Society for Applied Ethology, Lillehammer, Norway, p. 70.
- Houpt, K.A., 2002. Formation and dissolution of the mare–foal bond. *Applied Animal Behaviour Science* 78, 319-328. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00111-9)
- Hudson, R., Bautista, A., Reyes - Meza, V., Montor, J.M., Rödel, H.G., 2011. The effect of siblings on early development: a potential contributor to personality differences in mammals. *Developmental Psychobiology* 53, 564-574. <https://doi.org/10.1002/dev.20535>
- Hudson, R., Rangassamy, M., Saldaña, A., Bánszegi, O., Rödel, H.G., 2015. Stable individual differences in separation calls during early development in cats and mice. *Frontiers in Zoology* 12, S12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S12>
- Hudson, R., Chacha, J., Bánszegi, O., Szenczi, P., Rödel, H.G., 2017. Highly stable individual differences in the emission of separation calls during early development in the domestic cat. *Developmental Psychobiology* 59, 367-374. <https://doi.org/10.1002/dev.21501>
- Ille, N., Erber, R., Aurich, C., Aurich, J., 2014. Comparison of heart rate and heart rate variability obtained by heart rate monitors and simultaneously recorded electrocardiogram signals in nonexercising horses. *Journal of Veterinary Behavior* 9, 341-346. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.07.006>

- Janczak, A., Pedersen, L.J., Bakken, M., 2001. Do pigs have consistent personality traits?, 25th Congress of the International Society of Applied Ethology, pp. 161-161.
- Jensen, M.B., Munksgaard, L., Mogensen, L., Krohn, C.C., 1999. Effects of housing in different social environments on open-field and social responses of female dairy calves. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science* 49, 113-120.  
<https://doi.org/10.1080/090647099424178>
- Jensen, P., 2006. Domestication—From behaviour to genes and back again. *Applied Animal Behaviour Science* 97, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.11.015>
- Jeziński, T., Jaworski, Z., Gorecka, A., 1999. Effects of handling on behaviour and heart rate in Konik horses: comparison of stable and forest reared youngstock. *Applied Animal Behaviour Science* 62, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00209-3)
- Kaiser, S., Hennessy, M.B., Sachser, N., 2015. Domestication affects the structure, development and stability of biobehavioural profiles. *Frontiers in Zoology* 12, S19.  
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S19>
- Keiper, R.R., Keenan, M.A., 1980. Nocturnal activity patterns of feral ponies. *Journal of Mammalogy* 61, 116-118. <https://doi.org/10.2307/1379963>
- Keiser, C.N., Lichtenstein, J., Wright, C.M., Chism, G.T., Pruitt, J.N., 2018. Personality and behavioral syndromes in insects and spiders, in: Córdoba-Aguilar, A., González-Tokman, D., Santoyo-González, I. (Eds.), *Insect behavior. From mechanisms to ecological and evolutionary consequences*, Oxford University Press, U.K., pp. 237-257.
- Kelleher, S.R., Silla, A.J., Byrne, P.G., 2018. Animal personality and behavioral syndromes in amphibians: a review of the evidence, experimental approaches, and implications for conservation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 72, 79.  
<https://doi.org/10.1007/s00265-018-2493-7>
- Khalil, A.M., Kaseda, Y., 1997. Behavioral patterns and proximate reason of young male separation in Misaki feral horses. *Applied Animal Behaviour Science* 54, 281-289.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00004-X)
- Knubben, J., Fürst, A., Gygas, L., Stauffacher, M., 2008. Bite and kick injuries in horses: Prevalence, risk factors and prevention. *Equine Veterinary Journal* 40, 219-223.  
<https://doi.org/10.2746/042516408X253118>
- Koenen, E., Aldridge, L., Philipsson, J., 2004. An overview of breeding objectives for warmblood sport horses. *Livestock Production Science* 88, 77-84.  
<https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2003.10.011>
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., van Der Vegt, B.J., van Reenen, C.G., Hopster, H., de Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23, 925-935.  
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Koolhaas, J.M., De Boer, S.F., Buwalda, B., van Reenen, K., 2007. Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution* 70, 218-226. <https://doi.org/10.1159/000105485>
- Koolhaas, J.M., 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain, Behavior and Immunity* 22, 662-667.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.11.006>

- Kozak, A., Zięba, G., Tietze, M., Rozempolska-Rucińska, I., 2018. Consistency of emotional reactivity assessment results obtained in different behavioural tests. *Applied Animal Behaviour Science* 205, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.05.013>
- Kralj-Fišer, S., Schuett, W., 2014. Studying personality variation in invertebrates: why bother? *Animal Behaviour* 91, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.02.016>
- Kuwahara, M., Hashimoto, S., Ishii, K., Yagi, Y., Hada, T., Hiraga, A., Kai, M., Kubo, K., Oki, H., Tsubone, H., 1996. Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse. *Journal of the Autonomic Nervous System* 60, 43-48. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(96\)00028-8](https://doi.org/10.1016/0165-1838(96)00028-8)
- Langenhof, M.R., Komdeur, J., 2018. Why and how the early-life environment affects development of coping behaviours. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 72, 34. <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2452-3>
- Lansade, L., Bertrand, M., Boivin, X., Bouissou, M.-F., 2004. Effects of handling at weaning on manageability and reactivity of foals. *Applied Animal Behaviour Science* 87, 131-149. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.12.011>
- Lansade, L., Bouissou, M.F., Boivin, X., 2007. Temperament in preweaning horses: development of reactions to humans, novelty and startle responses. *Developmental Psychobiology* 49, 501-513. <https://doi.org/10.1002/dev.20233>
- Lansade, L., Bouissou, M.F., Erhard, H.W., 2008a. Reactivity to isolation and association with conspecifics: a temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science* 109, 355-373. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.003>
- Lansade, L., Bouissou, M.F., 2008. Reactivity to humans: a temperament trait of horses which is stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science* 114, 492-508. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.04.012>
- Lansade, L., Bouissou, M.F., Erhard, H.W., 2008b. Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science* 115, 182-200. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.06.011>
- Lansade, L., Pichard, G., Leconte, M., 2008c. Sensory sensitivities: Components of a horse's temperament dimension. *Applied Animal Behaviour Science* 114, 534-553. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.02.012>
- Lansade, L., Philippon, P., Hervé, L., Vidament, M., 2016. Development of personality tests to use in the field, stable over time and across situations, and linked to horses' show jumping performance. *Applied Animal Behaviour Science* 176, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.01.005>
- Lansade, L., Foury, A., Reigner, F., Vidament, M., Guettier, E., Bouvet, G., Soulet, D., Parias, C., Ruet, A., Mach, N., 2018. Progressive habituation to separation alleviates the negative effects of weaning in the mother and foal. *Psychoneuroendocrinology* 97, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.005>
- Le Scolan, N., Hausberger, M., Wolff, A., 1997. Stability over situations in temperamental traits of horses as revealed by experimental and scoring approaches. *Behavioural Processes* 41, 257-266. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(97\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(97)00052-1)
- Leliveld, L.M.C., Döpjan, S., Tuchscherer, A., Puppe, B., 2017. Vocal correlates of emotional reactivity within and across contexts in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Physiology & Behavior* 181, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.010>

- Lesimple, C., Gautier, E., Benhajali, H., Rochais, C., Lunel, C., Bensaïd, S., Khalloufi, A., Henry, S., Hausberger, M., 2019. Stall architecture influences horses' behaviour and the prevalence and type of stereotypies. *Applied Animal Behaviour Science* 219, 104833. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104833>
- Lessells, C.M., Boag, P.T., 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *The Auk* 104, 116-121. <https://doi.org/10.2307/4087240>
- Levine, M.A., 2005. Domestication and early history of the horse, in: Mills, D.S., McDonnell, S. (Eds.), *The domestic horse: the origins, development and management of its behaviour*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 5-24.
- Ligout, S., Bouissou, M.-F., Boivin, X., 2008. Comparison of the effects of two different handling methods on the subsequent behaviour of Anglo-Arabian foals toward humans and handling. *Applied Animal Behaviour Science* 113, 175-188.
- Lilienfeld, S.O., Penna, S., 2001. Anxiety sensitivity: Relations to psychopathy, DSM-IV personality disorder features, and personality traits. *Journal of Anxiety Disorders* 15, 367-393. [https://doi.org/10.1016/S0887-6185\(01\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0887-6185(01)00070-6)
- Lloyd, A.S., Martin, J.E., Bornett-Gauci, H.L.I., Wilkinson, R.G., 2007. Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.017>
- Lloyd, A.S., Martin, J.E., Bornett-Gauci, H.L.I., Wilkinson, R.G., 2008. Horse personality: variation between breeds. *Applied Animal Behaviour Science* 112, 369-383. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.08.010>
- MacDonald, K., 1983. Stability of individual differences in behavior in a litter of wolf cubs (*Canis lupus*). *Journal of Comparative Psychology* 97, 99-106. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.97.2.99>
- MacKay, J., Turner, S., Hyslop, J., Deag, J., Haskell, M., 2013. Short-term temperament tests in beef cattle relate to long-term measures of behavior recorded in the home pen. *Journal of Animal Science* 91, 4917-4924. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5473>
- MacKay, J.R., Haskell, M.J., 2015. Consistent individual behavioral variation: the difference between temperament, personality and behavioral syndromes. *Animals* 5, 455-478. <https://doi.org/10.3390/ani5030366>
- Mackenzie, S.A., Thiboutot, E., 1997. Stimulus reactivity tests for the domestic horse (*Equus caballus*). *Equine Practice* 19, 21-22.
- Manteca, X., Deag, J., 1993. Individual differences in temperament of domestic animals: a review of methodology. *Animal Welfare* 2, 247-268.
- Manteuffel, G., Puppe, B., Schön, P.C., 2004. Vocalization of farm animals as a measure of welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 88, 163-182. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.012>
- Maros, K., Boross, B., Kubinyi, E., 2010. Approach and follow behaviour—possible indicators of the human–horse relationship. *Interaction Studies* 11, 410-427. <https://doi.org/10.1075/is.11.3.05mar>
- Martínez-Byer, S., Urrutia, A., Szenczi, P., Hudson, R., Bánszegi, O., 2020. Evidence for individual differences in behaviour and for behavioural syndromes in adult shelter cats. *Animals* 10, 962. <https://doi.org/10.3390/ani10060962>



- McCrae, R.R., Costa Jr, P.T., Ostendorf, F., Angleitner, A., Hřebíčková, M., Avia, M.D., Sanz, J., Sanchez-Bernardos, M.L., Kusdil, M.E., Woodfield, R., 2000. Nature over nurture: temperament, personality, and life span development. *Journal of Personality and Social Psychology* 78, 173-186. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.78.1.173>
- McDonnell, S.M., 2003. The equid ethogram: a practical field guide to horse behavior. The Blood Horse, Inc., EUA.
- McGreevy, P.D., 2004. Social behavior, in: McGreevy, P.D. (Ed.), *Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists*, Saunders, London, U.K., pp. 119-150.
- McGreevy, P.D., 2007. The advent of equitation science. *The Veterinary Journal* 174, 492-500. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.09.008>
- McKeever, K.H., Arent, S.M., Davitt, P., 2013. Endocrine and immune responses to exercise, in: Hodgson, D.R., McGowan, C.M., McKeever, K. (Eds.), *The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine*, Elsevier, EUA, pp. 88-107.
- Meale, S.J., Chaucheyras-Durand, F., Berends, H., Steele, M.A., 2017. From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science* 100, 5984-5995. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12474>
- Mehta, P.H., Gosling, S.D., 2008. Bridging human and animal research: A comparative approach to studies of personality and health. *Brain, Behavior and Immunity* 22, 651-661. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.01.008>
- Mengoli, M., Pageat, P., Lafont-Lecuelle, C., Monneret, P., Giacalone, A., Sighieri, C., Cozzi, A., 2014. Influence of emotional balance during a learning and recall test in horses (*Equus caballus*). *Behavioural Processes* 106, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.05.004>
- Merkies, K., DuBois, C., Marshall, K., Parois, S., Graham, L., Haley, D., 2016. A two-stage method to approach weaning stress in horses using a physical barrier to prevent nursing. *Applied Animal Behaviour Science* 183, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.07.004>
- Mignon-Grasteau, S., Boissy, A., Bouix, J., Faure, J.-M., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Jensen, P., Le Neindre, P., Mormede, P., Prunet, P., 2005. Genetics of adaptation and domestication in livestock. *Livestock Production Science* 93, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.11.001>
- Mills, D., 1998. Personality and individual differences in the horse, their significance, use and measurement. *Equine Veterinary Journal* 30, 10-13. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb05137.x>
- Momozawa, Y., Ono, T., Sato, F., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Kusunose, R., 2003. Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. *Applied Animal Behaviour Science* 84, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.08.001>
- Moons, C.P.H., Laughlin, K., Zanella, A.J., 2005. Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Applied Animal Behaviour Science* 91, 321-335. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.10.007>
- Müller, T., Müller, C., 2015. Behavioural phenotypes over the lifetime of a holometabolous insect. *Frontiers in Zoology* 12, S8. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S8>

- Nagel, C., Ille, N., Erber, R., Aurich, C., Aurich, J., 2015. Stress response of veterinary students to gynaecological examination of horse mares - Effects of simulator - based and animal - based training. *Reproduction in Domestic Animals* 50, 866-871.  
<https://doi.org/10.1111/rda.12600>
- Nagy, K., Bodó, G., Bárdos, G., Bánszky, N., Kabai, P., 2010. Differences in temperament traits between crib-biting and control horses. *Applied Animal Behaviour Science* 122, 41-47.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.11.005>
- Nakagawa, S., Schielzeth, H., 2010. Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists. *Biological Reviews* 85, 935-956.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00141.x>
- Nawroth, C., Prentice, P.M., McElligott, A.G., 2017. Individual personality differences in goats predict their performance in visual learning and non-associative cognitive tasks. *Behavioural Processes* 134, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.08.001>
- Neave, H.W., Costa, J.H.C., Weary, D.M., Von Keyserlingk, M.A.G., 2020. Long-term consistency of personality traits of cattle. *Royal Society Open Science* 7, 191849.  
<https://doi.org/10.1098/rsos.191849>
- Nimmo, D.G., Miller, K.K., 2007. Ecological and human dimensions of management of feral horses in Australia: a review. *Wildlife Research* 34, 408-417.  
<https://doi.org/10.1071/WR06102>
- Norton, T., Piette, D., Exadaktylos, V., Berckmans, D., 2018. Automated real-time stress monitoring of police horses using wearable technology. *Applied Animal Behaviour Science* 198, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.09.009>
- Perals, D., Griffin, A.S., Bartomeus, I., Sol, D., 2017. Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? *Animal Behaviour* 123, 69-79.  
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.10.006>
- Pereira-Figueiredo, I., Costa, H., Carro, J., Stilwell, G., Rosa, I., 2017. Behavioural changes induced by handling at different timeframes in Lusitano yearling horses. *Applied Animal Behaviour Science* 196, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.06.016>
- Pierard, M., McGreevy, P., Geers, R., 2017. Developing behavioral tests to support selection of police horses. *Journal of Veterinary Behavior* 19, 7-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.01.005>
- Porges, S.W., 1991. Vagal tone: An autonomic mediator of affect, in: Garber, J., Dodge, K., (Eds.), *Cambridge studies in social and emotional development. The development of emotion regulation and dysregulation* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 111-128.
- Porges, S.W., 1995. Orienting in a defensive world: Mammalian modifications of our evolutionary heritage. A polyvagal theory. *Psychophysiology* 32, 301-318.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1995.tb01213.x>
- Powell, D.M., Gartner, M.C., 2011. Applications of personality to the management and conservation of nonhuman animals, in: Inoue-Murayama, M.K., S., Weiss, A. (Eds.), *From genes to animal behavior. Social structures, personalities, communication by color*, Springer, Tokyo, pp. 185-199.

- Price, E.O., Thos, J., 1980. Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats. *Applied Animal Ethology* 6, 331-339. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(80\)90133-9](https://doi.org/10.1016/0304-3762(80)90133-9)
- Price, E.O., 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology* 59, 1-32. <https://doi.org/10.1086/413673>
- Price, E.O., 1999. Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 245-271. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00087-8)
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews* 82, 291-318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x>
- Réale, D., Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N., Wright, J., 2010. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0222>
- Reid, K.A., Rogers, C.W., Gronqvist, G., Gee, E.K., Bolwell, C.F., 2017. Anxiety and pain in horses measured by heart rate variability and behavior. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 22, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.09.002>
- Rietmann, T.R., Stuart, A.E.A., Bernasconi, P., Stauffacher, M., Auer, J.A., Weishaupt, M.A., 2004. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Applied Animal Behaviour Science* 88, 121-136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.016>
- Rifá, H., 1990. Social facilitation in the horse (*Equus caballus*). *Applied Animal Behaviour Science* 25, 167-176. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90078-R](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90078-R)
- Roberts, K., Hemmings, A.J., Moore-Colyer, M., Parker, M.O., McBride, S.D., 2016. Neural modulators of temperament: A multivariate approach to personality trait identification in the horse. *Physiology & Behavior* 167, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.029>
- Roche, D.G., Careau, V., Binning, S.A., 2016. Demystifying animal 'personality' (or not): why individual variation matters to experimental biologists. *Journal of Experimental Biology* 219, 3832-3843. <https://doi.org/10.1242/jeb.146712>
- Romeyer, A., Bouissou, M.-F., 1992. Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science* 34, 93-119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(05\)80060-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(05)80060-7)
- Rothbart, M.K., Ahadi, S.A., Evans, D.E., 2000. Temperament and personality: origins and outcomes. *Journal of Personality and Social Psychology* 78, 122-134. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.78.1.122>
- Ruet, A., Lemarchand, J., Parias, C., Mach, N., Moisan, M.-P., Foury, A., Briant, C., Lansade, L., 2019. Housing horses in individual boxes is a challenge with regard to welfare. *Animals* 9, 621. <https://doi.org/10.3390/ani9090621>
- Ruis, M.A., te Brake, J.H., van de Burgwal, J.A., de Jong, I.C., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M., 2000. Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Applied Animal Behaviour Science* 66, 31-47. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00070-2)

- Rushen, J., De Passille, A., Munksgaard, L., 1999a. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. *Journal of Dairy Science* 82, 720-727. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75289-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75289-6)
- Rushen, J., Taylor, A.A., de Passillé, A.M., 1999b. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 285-303. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00089-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00089-1)
- Sackman, J.E., Houpt, K.A., 2019. Equine personality: Association with breed, use, and husbandry factors. *Journal of Equine Veterinary Science* 72, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.018>
- Schmidt, A., Möstl, E., Wehnert, C., Aurich, J., Müller, J., Aurich, C., 2010. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior* 57, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.11.003>
- Seaman, S.C., Davidson, H.P.B., Waran, N.K., 2002. How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? *Applied Animal Behaviour Science* 78, 175-191. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00095-3)
- Shanahan, S., 2003. Trailer loading stress in horses: behavioral and physiological effects of nonaversive training (TTEAM). *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6, 263-274. [https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0604\\_1](https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0604_1)
- Sih, A., Bell, A.M., Johnson, J.C., Ziemba, R.E., 2004. Behavioral syndromes: an integrative overview. *The Quarterly Review of Biology* 79, 241-277. <https://doi.org/10.1086/422893>
- Søndergaard, E., Halekoh, U., 2003. Young horses' reactions to humans in relation to handling and social environment. *Applied Animal Behaviour Science* 84, 265-280. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.08.011>
- Søndergaard, E., Ladewig, J., 2004. Group housing exerts a positive effect on the behaviour of young horses during training. *Applied Animal Behaviour Science* 87, 105-118. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.12.010>
- Stamps, J., Groothuis, T.G.G., 2010a. The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews* 85, 301-325. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00103.x>
- Stamps, J.A., Groothuis, T.G.G., 2010b. Developmental perspectives on personality: implications for ecological and evolutionary studies of individual differences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 4029-4041. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0218>
- Stamps, J.A., Biro, P.A., 2016. Personality and individual differences in plasticity. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 12, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.08.008>
- Stucke, D., Ruse, M.G., Lebelt, D., 2015. Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity—Pros and cons of different methods. *Applied Animal Behaviour Science* 166, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.02.007>
- Szenczi, P., Bánszegi, O., Urrutia, A., Faragó, T., Hudson, R., 2016. Mother–offspring recognition in the domestic cat: Kittens recognize their own mother's call. *Developmental Psychobiology* 58, 568-577. <https://doi.org/10.1002/dev.21402>

- Tetley, C.L., O'Hara, S.J., 2012. Ratings of animal personality as a tool for improving the breeding, management and welfare of zoo mammals. *Animal Welfare* 21, 463-476. <https://doi.org/10.7120/09627286.21.4.463>
- Thomas, K.E., Annett, J.L., Gilchrist, J., Bixby-Hammett, D.M., 2006. Non-fatal horse related injuries treated in emergency departments in the United States, 2001–2003. *British Journal of Sports Medicine* 40, 619-626. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2006.025858>
- Toms, C.N., Echevarria, D.J., Jouandot, D.J., 2010. A methodological review of personality-related studies in fish: focus on the shy-bold axis of behavior. *International Journal of Comparative Psychology* 23, 1-25.
- Trillmich, F., Hudson, R., 2011. The emergence of personality in animals: the need for a developmental approach. *Developmental Psychobiology* 53, 505-509. <https://doi.org/doi.org/10.1002/dev.20573>
- Trillmich, F., Günther, A., Müller, C., Reinhold, K., Sachser, N., 2015. New perspectives in behavioural development: adaptive shaping of behaviour over a lifetime? *Frontiers in Zoology* 12, S1. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S1>
- Tyler, S.J., 1972. The behaviour and social organization of the New Forest Ponies. *Animal Behaviour Monographs* 5, 87-196. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(72\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(72)90003-6)
- Urrutia, A., Martínez-Byer, S., Szenczi, P., Hudson, R., Bánszegi, O., 2019. Stable individual differences in vocalisation and motor activity during acute stress in the domestic cat. *Behavioural Processes* 165, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.022>
- van Oers, K., Naguib, M., 2013. Avian personality, in: Carere, C., Maestripieri, D. (Eds.), *Animal personalities: behavior, physiology, and evolution*, The University of Chicago Press, USA pp. 66-95.
- van Reenen, C., Engel, B., Ruis-Heutinck, L., Van der Werf, J., Buist, W., Jones, R., Blokhuis, H., 2004. Behavioural reactivity of heifer calves in potentially alarming test situations: a multivariate and correlational analysis. *Applied Animal Behaviour Science* 85, 11-30. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.09.007>
- Vandenheede, M., Bouissou, M.-F., Picard, M., 1998. Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science* 58, 293-310. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00088-4)
- Veenema, A.H., Cremers, T.I., Jongsma, M.E., Steenbergen, P.J., de Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 2005. Differences in the effects of 5-HT 1A receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. *Psychopharmacology* 178, 151-160. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2005-5>
- Viérin, M., Bouissou, M.F., 2003. Responses of weaned lambs to fear - eliciting situations: Origin of individual differences. *Developmental Psychobiology* 42, 131-147. <https://doi.org/10.1002/dev.10090>
- Vigne, J.-D., 2011. The origins of animal domestication and husbandry: a major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes Rendus Biologies* 334, 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.009>
- Villas-Boas, J.D., Dias, D.P.M., Trigo, P.I., dos Santos Almeida, N.A., de Almeida, F.Q., de Medeiros, M.A., 2016. Behavioural, endocrine and cardiac autonomic responses to a model of startle in horses. *Applied Animal Behaviour Science* 174, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.10.005>

- Visser, E.K., van Reenen, C.G., Hopster, H., Schilder, M.B.H., Knaap, J.H., Barneveld, A., Blokhuis, H.J., 2001. Quantifying aspects of young horses' temperament: consistency of behavioural variables. *Applied Animal Behaviour Science* 74, 241-258. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00177-0)
- Visser, E.K., van Reenen, C.G., van der Werf, J.T.N., Schilder, M.B.H., Knaap, J.H., Barneveld, A., Blokhuis, H.J., 2002. Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. *Physiology & Behavior* 76, 289-296. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00698-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00698-4)
- Visser, E.K., van Reenen, C.G., Rundgren, M., Zetterqvist, M., Morgan, K., Blokhuis, H.J., 2003a. Responses of horses in behavioural tests correlate with temperament assessed by riders. *Equine Veterinary Journal* 35, 176-183. <https://doi.org/doi.org/10.2746/042516403776114108>
- Visser, E.K., van Reenen, C.G., Engel, B., Schilder, M.B.H., Barneveld, A., Blokhuis, H.J., 2003b. The association between performance in show-jumping and personality traits earlier in life. *Applied Animal Behaviour Science* 82, 279-295. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00083-2)
- Visser, E.K., Van Dierendonck, M., Ellis, A.D., Rijksen, C., Van Reenen, C.G., 2009. A comparison of sympathetic and conventional training methods on responses to initial horse training. *The Veterinary Journal* 181, 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.009>
- von Borell, E., Langbein, J., Després, G., Hansen, S., Leterrier, C., Marchant-Forde, J., Marchant-Forde, R., Minero, M., Mohr, E., Prunier, A., 2007. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—a review. *Physiology & Behavior* 92, 293-316. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.01.007>
- von Borstel, U.K., Pasing, S., Gauly, M., 2011. Towards a more objective assessment of equine personality using behavioural and physiological observations from performance test training. *Applied Animal Behaviour Science* 135, 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.007>
- von Borstel, U.K., Pasing, S., Gauly, M., Christmann, L., 2013. Status quo of the personality trait evaluation in horse breeding: Judges' assessment of the situation and strategies for improvement. *Journal of Veterinary Behavior* 8, 326-334. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2013.04.066>
- Wallner, B., Palmieri, N., Vogl, C., Rigler, D., Bozlak, E., Druml, T., Jagannathan, V., Leeb, T., Fries, R., Tetens, J., 2017. Y chromosome uncovers the recent oriental origin of modern stallions. *Current Biology* 27, 2029-2035. e2025. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.086>
- Waran, N., Casey, R., 2005. Horse training, in: Mills, D.S., McDonnell, S.M. (Eds.), *The domestic horse: the origins, development and management of its behaviour*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 184-195.
- Whisher, L., Raum, M., Pina, L., Pérez, L., Erb, H., Houpt, C., Houpt, K., 2011. Effects of environmental factors on cribbing activity by horses. *Applied Animal Behaviour Science* 135, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.09.001>

- Wolf, M., Weissing, F.J., 2012. Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.001>
- Wolff, A., Hausberger, M., Le Sclan, N., 1997. Experimental tests to assess emotionality in horses. *Behavioural Processes* 40, 209-221. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(97\)00784-5](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(97)00784-5)
- Wolski, T.R., Houpt, K.A., Aronson, R., 1980. The role of the senses in mare—foal recognition. *Applied Animal Ethology* 6, 121-138. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(80\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0304-3762(80)90064-4)
- Wuerz, Y., Krüger, O., 2015. Personality over ontogeny in zebra finches: long-term repeatable traits but unstable behavioural syndromes. *Frontiers in Zoology* 12, S9. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S9>
- Zuckerman, M., 1991. Consistency of personality, *Psychobiology of personality*, Cambridge University Press, UK, pp. 44-66.