



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y FISIOLÓGICAS EN SITUACIONES DE ESTRÉS EN EL PERRO Y EL GATO

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por:

Camino García-Morato Fernández-Baíllo

Bajo la dirección del **Dr. Xavier Manteca Vilanova** y de la **Dra. Marta Amat Grau**

Programa de doctorado de Producción Animal del Departamento de Ciencia Animal y de los
Alimentos de la Universidad Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2019



Xavier Manteca Vilanova, catedrático del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona y Marta Amat Grau, investigadora del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Respuestas comportamentales y fisiológicas en situaciones de estrés en el perro y el gato”**, presentada por Camino García-Morato Fernández-Baíllo para optar por el grado de Doctora en Veterinaria, se ha realizado bajo su dirección y, considerándola acabada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra el 25 de noviembre de 2019.

Dr. Xavier Manteca Vilanova

Dra. Marta Amat Grau

Camino García-Morato Fernández-Baíllo
(doctoranda)

Para la realización de la tesis la autora fue beneficiaria de una beca predoctoral FI-DGR (Ref. 2015FI_B01087), con el apoyo de la Secretaría de Universidades e Investigación del Departamento de Empresa y Conocimiento de la Generalitat de Catalunya.

"But while you are studying, observing, experimenting, do not remain content with the surface of things. Do not become a mere recorder of facts, but try to penetrate the mystery of their origin... In your work and in your research there must always be passion."

Ivan Pavlov

"Estoy tan solo como este gato, y mucho más solo porque lo sé y él no"

Julio Cortázar

AGRADECIMIENTOS

Curiosamente los agradecimientos constituyen la única parte de la tesis que he tenido más o menos clara desde el primer momento y casi diría que de lo poco que se ha mantenido tal cual era la idea original. Desde el principio pensé que lo mejor era incluir solo a unas pocas personas, las que más peso han tenido por un motivo u otro en estos años de elaboración de la tesis. Así que a ello voy.

En primer lugar, las tres mujeres que han hecho esto posible.

- Marta Amat: no hubiera podido iniciar este camino si no te hubieras fijado en mí allá por 2011-2012. Me fui a Toledo pensando que desarrollaría allí la etología y qué sorpresa cuando apenas unos meses después Xavi me comentó en un congreso en Francia que querías que formara parte del equipo. Tiene que haber personas que abran las puertas de la oportunidad y tú me la abriste. Me has ayudado y asesorado mucho en este tiempo. Me has enseñado que se puede ser *multitasking* sin morir en el intento, me has resuelto dos millones de dudas sobre medicación y otras cuestiones de los casos y me has defendido cuando ha tocado. ¡Ah, también he aprendido contigo a comer ultrarrápido a mediodía para no seguir en el primer plato cuando tú ya ibas por el postre! Gracias por hacer esto posible. Y, por supuesto, gracias por ser mi directora de tesis.
- Tía (monkey) / Dolores García-Morato: pongo tu nombre porque, conociéndote, seguro que no querrás que solo incluya el apelativo que uso contigo. Qué decir de mi tía preferida, la que me ha acompañado toda la vida y la que no duda ni un segundo cuando necesito ayuda. Y así ocurrió durante el desarrollo de esta tesis, muy al principio, cuando me quedé sin recursos para continuar hasta que conseguí la beca. Como siempre, tú estuviste a mi lado y me ayudaste. Sin ti no hubiera podido seguir. Eres pieza fundamental de estos años y en mi vida en general. Si tiene que haber una persona a la que le dedique estas tesis, sin duda, te la dedico a ti. Eres uno de mis mayores ejemplos de fortaleza mental, una persona increíblemente dura que ha enfrentado los varapalos de una forma que admiro. Te quiero, monkey.
- Mamá (Pilar Fernández-Baíllo): tú eres mi pilar, en general. El pilar de mi vida. Y, por supuesto, también lo has sido durante estos años de elaboración de la tesis. También eres pieza fundamental en este proceso. Entre otras muchas cosas porque “no me dejaste irme” cuando opté por desistir al principio por cuestiones no relacionadas con el doctorado. Eres mi ejemplo de superación, de fuerza de voluntad, de honradez en el trabajo y en la vida. Eres la primera persona en la que pienso cuando me siento insegura o tengo dudas. Eres mi asesora en todo lo relacionado con cuestiones estéticas (¡qué portada más bonita creaste junto con Meli y Carola!). También eres con quien más discuto, pero creo que eso no se debe poner en unos agradecimientos, jajaja. Bueno, en definitiva, eres la persona por las que más cosas daría en mi vida. Te quiero mucho, mamá.

En segundo lugar, los tres hombres que han formado parte de manera especial estos años:

- Xavi Manteca: además de ser mi director (un gran director), eres una enciclopedia andante. No te imaginas la de veces que he comentado que me gustaría que existiera una tecnología que transfiriera directamente los conocimientos de una cabeza a otra. Sinceramente, dudo que en todos los años que espero que me queden pueda aprender tantas cosas como sabes tú. Eres mi ejemplo de rigurosidad y excelencia en el trabajo. Me hubiera encantado poder tener muchas más charlas contigo sobre plasticidad, socialización, emociones, etc., etc. Aun así, sin apenas tener tiempo para ti, me has atendido cada vez que te lo he pedido. Muchas gracias por todo.
- Sergio Tejedor (alias Melón): si mi madre es la persona con la que más discuto en el mundo, tú eres la persona con la que más he discutido en el departamento, jajaja. Te lo he dicho un montón de veces: eres un crack. Eres el mayor crack que he conocido hasta el momento trabajando con animales. Los primeros años me pasé trabajando y aprendiendo a tu lado más horas de las que puedo contar. Cómo he echado en falta aquellos viajes de vuelta en coche tras hacer una visita en los que hablábamos sin parar de aprendizaje, de memoria, de técnicas... Lo más valioso que me llevo de este tiempo de elaboración de la tesis es la base teórica amplia que he generado a base de leer e indagar. Sin duda, quien que me abrió la mente y me enseñó a cuestionar lo que ya sabía fuiste tú. Eres la persona de la que más he aprendido estos años.
- Papá (Eugenio García-Morato): de ti he heredado el “cabezonismo” (en todos los sentidos) y esa fuerza de voluntad a la hora de enfrentar el estudio. Siempre he admirado tu inteligencia y me ha encantado sacarte temas interesantes para comentar, sobre todo relacionados con la ciencia. Ya incluso de pequeña leía la Muy Interesante para aprender cosas y luego poder hablarlas contigo. Así que en parte eres el culpable de mis ansias por saber más. No tenemos instaurada la rutina de la llamada diaria, como con mamá, pero sé que te vas enterando de todo. Y cada vez que necesito cualquier cosa tardas medio segundo en gestionármelo. Está claro que soy tu preferida (estaría bien que esto lo leyeran mis hermanos, je). Te quiero mucho, papá.

En tercer lugar, Punsí (Ana Ruiz Heredia). He dejado para lo último los agradecimientos porque me costaba mucho la idea de que formarás parte de ellos de manera diferente a como lo imaginé en los inicios. Eres literalmente la persona que ha estado a mi lado en estos años, casi hasta el final. Creo que son incontables las horas que nos hemos pasado hablando de neurociencia y medicina. Y, bueno, todo lo demás que hemos compartido. Tengo un recuerdo especialmente intenso de aquel congreso en Bristol cuya charla me fue horriblemente mal y tú fuiste quien me sacó de ese estado. Menos mal que estabas allí. La imagen de nosotras paseando y hablando tras el desastre de la charla a lo largo de ese puerto ha quedado fijada en mi memoria. Eres mi ejemplo de constancia y perseverancia, no te rindes nunca. Te terminaron aceptando de nuevo en medicina porque eres mu pesá, jajaja. Vas a terminar la carrera este año y me siento tremendamente orgullosa de ti. Me alegra haber formado parte también de tu camino. Te quiero mucho y te voy a querer siempre.

En cuarto lugar, Meli o negrita (Melissa Silva Franco). Has sido la última en subir al barco. Me has acompañado en estos últimos 6 meses tan duros por diferentes motivos. Me has enseñado que improvisar puede ser bueno a veces – solo a veces – y las bondades de echarle morro a la vida. Conozco pocas personas más eficientes que tú a pesar de lo dispersa que eres (es un halago). Me has acercado de nuevo a las letras y estoy deseando terminar esta etapa para saber otra vez lo que es tener tiempo libre y disfrutarlo contigo. Gracias por aparecer y permanecer. Gracias también por ayudarme a materializar mi próximo sueño: conocer a LeDoux en Nueva York. Y gracias por regalarme la portada de la tesis, ¡ha quedado tan bonita! Por cierto, ¿quieres que instauremos la nueva rutina de decirnos una palabra de final de tesis? La mía “son” las tres únicas palabras de *Lettre à Élise*. ¿Y la tuya?

En quinto lugar, voy a imitar a mi amiga Neus Biosca –“la de neurociencias” – y voy a incluir a mis perros. Me pareció una idea genial, pues aunque no les puedo agradecer una acción consciente dirigida a ayudarme, representan en parte el motivo por el que me dedico a esto y me alegran la vida. Por un lado están mi Nuca y mi Jacky, que se fueron el año pasado. Parece mentira que fueran madre e hijo. Nuca tan rubia, tan delicada (menos cuando roncaba), con ese saber estar perruno que nunca fui capaz de explicar desde mi mente científica. Y Jacky tan negro y tan bruto, un “ansias” bonachón. Y luego está mi Chipi, que sigue esperándome pacientemente en Toledo aunque él ni lo sepa. Todavía no sé cómo un perro tan capullete puede ser el mejor del mundo (para mí, claro).

Y ya está. Termino los agradecimientos tal y como empecé esta andadura cuando hice el viaje de ida de Toledo a Barcelona: escuchando música, que es lo que más me gusta hacer. Como curiosidad, dejaré plasmado qué canción de mi lista suena justo ahora: Michigan – The Milk Carton Kids.

Gracias también a todos los que aunque no aparecéis me habéis acompañado en estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
RESUM	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. ESTRÉS: ASPECTOS GENERALES	9
1.1. Definición de estrés	9
1.2. Categorías de estímulos estresantes y respuestas asociadas	11
1.3. Respuesta de estrés	13
2. FACTORES QUE MODULAN LA RESPUESTA DE ESTRÉS	15
2.1. Características del estímulo estresante	15
2.1.1. Intensidad del estímulo estresante	15
2.1.2. Duración de la situación de estrés	15
2.1.3. Controlabilidad	16
2.1.4. Predictibilidad	16
2.1.5. Incertidumbre	17
2.2. Características propias del animal	17
3. CONSECUENCIAS & EFECTOS DEL ESTRÉS	19
3.1. Estrés como factor de riesgo de numerosas enfermedades	19
3.2. Estrés y sistema inmunitario	20
3.3. Efectos del estrés sobre el sistema nervioso central	21
3.3.1. Estrés ambiental perinatal	21
3.3.2. Aprendizaje y memoria	22
4. IMPLICACIONES DEL ESTRÉS EN ETOLOGÍA CLÍNICA	22
4.1. Problemas de comportamiento asociados	22
4.2. Limitación de la eficacia de las terapias conductuales	23

5. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS	24
5.1. Respuesta fisiológica	24
5.1.1. Matrices para detectar el cortisol	24
5.2. Comportamiento	26
5.3. Experiencia subjetiva	27
5.4. Función cognitiva	27
6. REFERENCIAS	28
OBJETIVOS	45
CAPÍTULO 1	49
1. INTRODUCCIÓN	51
2. MATERIAL & MÉTODOS	54
2.1. Primer experimento: estudio piloto	54
2.1.1. Población de estudio	54
2.1.2. Procedimiento	54
2.1.3. <i>Open field</i> & exposición al estímulo sonoro aversivo	55
2.1.4. Fases experimentales	57
2.1.4.1. Fase de pruebas	57
2.1.4.2. Fase de habituación	57
2.1.4.3. Fase de aplicación del estímulo aversivo	57
2.1.5. Análisis de datos	58
2.1.5.1. Análisis estadístico	59
2.2. Segundo experimento	59
2.2.1. Población de estudio	59
2.2.2. Procedimiento	60
2.2.3. <i>Open field</i> & exposición al estímulo sonoro aversivo	60
2.2.4. Organización cronológica del estudio	64
2.2.4.1. Primera toma de muestras	64
2.2.4.2. Fase de habituación	64
2.2.4.3. Fase de aplicación del estímulo aversivo	64

2.2.4.4.	Fase final sin exposición al estímulo aversivo	64
2.2.4.5.	Segunda toma de muestras	64
2.2.5.	Análisis de las muestras	65
2.2.6.	Extracción y cuantificación del cortisol	65
2.2.7.	Análisis estadístico	65
3.	RESULTADOS	66
3.1.	Primer experimento: estudio piloto	66
3.1.1.	Resultados globales	66
3.1.2.	Comparación entre periodos	67
3.1.2.1.	Análisis en duración de la ocurrencia de los eventos (expresado en tiempo/evento)	67
3.1.2.2.	Análisis en frecuencia por minuto (expresado en número de eventos/minuto)	69
3.2.	Segundo experimento	72
3.2.1.	Variables de comportamiento	72
3.2.1.1.	Análisis general en ausencia y en presencia del sonido aversivo	72
3.2.1.2.	Análisis detallado en ausencia del sonido aversivo	73
3.2.1.3.	Análisis detallado en presencia del sonido aversivo	77
3.2.2.	Variables fisiológicas	78
4.	DISCUSIÓN	79
4.1.	Respuestas conductuales y fisiológicas inducidas por la exposición a una situación estresante	79
4.2.	Efecto de la predictibilidad sobre la respuesta de estrés derivada de la exposición a un estímulo aversivo	84
4.3.	Limitaciones metodológicas	86
4.3.1.	Efecto del contexto	86
4.3.2.	Diferencias individuales	86
4.3.3.	Habitación	88
4.3.4.	Tamaño de la muestra	88
5.	CONCLUSIONES	89
6.	REFERENCIAS	89

CAPÍTULO 2 **103**

1. INTRODUCCIÓN	105
2. MATERIAL & MÉTODOS	108
2.1. Población de estudio	108
2.2. Problemas de comportamiento	108
2.3. Metodología	109
2.4. Muestreo del pelo	109
2.5. Análisis de las muestras	110
2.6. Extracción y cuantificación del cortisol	110
2.7. Análisis estadístico	111
3. RESULTADOS	112
4. DISCUSIÓN	114
4.1. Factores individuales y ambientales que pueden afectar a la concentración del cortisol en el pelo	114
4.2. Cortisol en pelo como medida de estrés crónico	117
5. CONCLUSIONES	119
6. REFERENCIAS	119

CAPÍTULO 3 **127**

1. INTRODUCCIÓN	129
2. ANTROPOMORFISMO EN LA CIENCIA COGNITIVA	129
2.1. Renacimiento del antropomorfismo en la ciencia y situación del debate actual	129
2.2. Problemas asociados al razonamiento analógico y al registro anecdótico	132
2.3. El <i>boom</i> de la cognición animal y las posibles limitaciones de los estudios	134
2.4. La importancia de generar hipótesis alternativas	136
3. ANTROPOMORFISMO EN LA CIENCIA DE LAS EMOCIONES	139
4. ANTROPOMORFISMO & BIENESTAR ANIMAL	143
5. ANTROPOMORFISMO, BIENESTAR DE LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA & ETOLOGÍA CLÍNICA	146

6. CONCLUSIONES	148
7. REFERENCIAS	150
DISCUSIÓN GENERAL	167
<hr/>	
1. PARÁMETROS DE COMPORTAMIENTO, MIEDO Y ANSIEDAD	169
1.1. Complicaciones asociadas a la poca consistencia en la terminología empleada	169
1.2. El uso confuso de las palabras miedo y ansiedad	170
1.3. Variabilidad en los parámetros de comportamiento utilizados	170
1.4. El <i>freezing</i> como ejemplo de las consecuencias de esta falta de consenso	172
2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DEL EJE HPA ASOCIADOS A ESTRÉS	174
2.1. Parámetros fisiológicos asociados al estrés	174
2.2. Utilización del cortisol como parámetro fisiológico representativo del eje HPA	175
2.3. Interrogantes pendientes y direcciones futuras	176
3. RELACIÓN DEL ESTRÉS Y LOS PROBLEMAS DE COMPORTAMIENTO & LIMITACIONES Y DIRECCIONES FUTURAS EN LAS INTERVENCIONES	178
3.1. Relación del estrés y los problemas de comportamiento	178
3.2. Experiencias tempranas y alteraciones de la conducta	179
3.3. Limitaciones y direcciones futuras en las intervenciones que reducen el estrés	181
4. PARÁMETROS CONDUCTUALES & FISIOLÓGICOS COMO REFLEJO DE LOS ESTADOS EMOCIONALES	183
4.1. Concepciones clásicas de las emociones versus teorías constructivistas	183
4.2. Importancia de una terminología precisa que permita discriminar entre los diferentes procesos que se dan en los contextos defensivos	185
4.3. Aproximación del debate a la ciencia del bienestar animal y a la etología clínica	187
5. REFERENCIAS	188
CONCLUSIONES	207
<hr/>	

RESUMEN

Los problemas de comportamiento en los que está implicado el estrés pueden tener múltiples consecuencias tanto para los animales como para el vínculo humano-animal. Por tales motivos, es necesario disponer de indicadores adecuados para evaluar de forma científica el impacto del estrés en las especies domésticas con las que convivimos, así como para valorar su evolución durante la aplicación de los protocolos de tratamiento. En este sentido, el análisis de los niveles de cortisol en pelo representa un método novedoso y ventajoso a nivel metodológico.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos dos objetivos principales en esta tesis. Por un lado, evaluar el efecto de la predictibilidad sobre las respuestas defensivas comportamentales y fisiológicas consecuencia del estrés derivado de la aplicación de un estímulo aversivo. Y, por otro lado, analizar el uso potencial de la determinación del cortisol en pelo para valorar el éxito de las estrategias dirigidas a reducir el estrés dentro de los protocolos de tratamiento habituales. Respecto al primer objetivo, no se pudo demostrar claramente esta cuestión, en parte debido a una serie de limitaciones metodológicas. En relación con el segundo objetivo, se encontró una tendencia ($P = 0.05$) en cuanto a las diferencias en los niveles de cortisol entre los grupos. Concretamente nivel de cortisol en pelo tendió a ser mayor en el grupo de gatos que mostraban cambios de comportamiento relacionados con el estrés (4.65 ± 1.79 pg/mg) con respecto al grupo control (4.13 ± 1.28 pg/mg). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la evolución de los niveles de cortisol en el tiempo ($P = 0.59$). Considerando estos resultados, no parece que la valoración de los niveles de cortisol en pelo sea un método adecuado para analizar el éxito de las intervenciones habitualmente utilizadas. Por otra parte, el color del pelo tuvo una influencia significativa ($P < 0,0001$), lo cual sugiere que es necesario tenerlo en cuenta al emplear esta metodología.

Por último, cabe apuntar a que durante el desarrollo de estos capítulos se detectaron importantes inconsistencias con relación a la terminología empleada en la literatura a la hora de describir los comportamientos defensivos en contextos de amenaza. Por ejemplo, en el caso concreto del *freezing* existen múltiples definiciones que varían ligeramente entre los diferentes estudios. El hecho de emplear una u otra puede llegar a condicionar en cierta medida los resultados obtenidos. Esta problemática impulsó el desarrollo del último capítulo de esta tesis, centrado en abordar la importancia de evitar las etiquetas sesgadas y de aplicar definiciones precisas. En la misma línea, se plantearon las consecuencias que se pueden generar como consecuencia de la extendida presencia del antropomorfismo en el campo del bienestar animal y en el contexto de la etología clínica.

RESUM

Els problemes de comportament en els que està implicat l'estrès poden tenir múltiples conseqüències tant pels animals com per al vincle humà-animal. Per aquests motius, és necessari disposar d'indicadors adequats per avaluar de forma científica l'impacte de l'estrès a les espècies domèstiques amb les que convivim, així com per valorar la seva evolució durant l'aplicació dels protocols de tractament. En aquest sentit, l'anàlisi dels nivells de cortisol al pèl representa un mètode innovador i avantatjós a nivell metodològic.

Tenint en compte aquests antecedents, ens plantegem dos objectius principals en aquesta tesi. Per una banda, avaluar l'efecte de la predictibilitat sobre les respostes defensives comportamentals i fisiològiques conseqüència de l'estrès derivat de l'aplicació d'un estímul aversiu. I, per altra banda, analitzar l'ús potencial de la determinació del cortisol en pèl per valorar l'èxit de les estratègies dirigides a reduir l'estrès dins dels protocols de tractament habituals. En relació amb el primer objectiu, no es va poder demostrar clarament aquesta qüestió, en part degut a una sèrie de limitacions metodològiques. En relació amb el segon objectiu, es va trobar una tendència ($P = 0,05$) pel que fa a les diferències en els nivells de cortisol entre els grups. Concretament, el nivell de cortisol en pèl tendeix a ser més elevat en el grup de gats que mostraven canvis de comportament relacionats amb l'estrès ($4,65 \pm 1,79$ pg/mg) respecte al grup control ($4,13 \pm 1,28$ pg/mg). Tot i així, no es van trobar diferències significatives entre els grups a l'evolució dels nivells de cortisol en el temps ($P = 0,59$). Considerant aquests resultats, no sembla que la valoració dels nivells de cortisol en pèl sigui un mètode adequat per analitzar l'èxit de les intervencions utilitzades habitualment. Per altra banda, el color del pèl va tenir una influència significativa ($P < 0,0001$), fet que suggereix que és necessari tenir-ho en compte a l'hora de fer servir aquesta metodologia.

Por últim, val a dir que durant el desenvolupament d'aquests capítols es van detectar importants inconsistències en relació amb la terminologia emprada a la literatura a l'hora de descriure els comportaments defensius en contextos d'amenaça. Per exemple, en el cas concret del *freezing* existeixen múltiples definicions que varien lleugerament entre els diferents estudis. El fet d'emprar una o altra pot arribar a condicionar en certa mesura els resultats obtinguts. Aquesta problemàtica va impulsar el desenvolupament de l'últim capítol d'aquesta tesi, centrada en abordar la importància d'evitar les etiquetes esbiaixades i d'aplicar definicions precises. En la mateixa línia, es van plantejar les conseqüències que es poden generar com a conseqüència de l'extensa presència de l'antropomorfisme en el camp del benestar animal y en el context de l'etologia clínica.

ABSTRACT

Behavioural problems in which stress is involved can have multiple consequences for both animals and the human-animal bond. It is, therefore, necessary to have adequate indicators so as to be able to scientifically assess the impact of stress on the domestic animals with which we live, as well as to assess how these indicators evolve during the application of treatment protocols. The analysis of cortisol levels in hair, thus, represents a novel and methodologically advantageous method.

Given this background, we set out to explore two main objectives in this thesis. On the one hand, to evaluate the effect of predictability on behavioural and physiological defence responses as a result of stress derived from the application of an aversive stimulus. And, on the other hand, to analyse the potential for using cortisol determination in hair to assess the success of strategies aimed at reducing stress within the usual treatment protocols. In terms of the first objective, this issue could not be clearly demonstrated, in part due to a series of methodological limitations. In relation to the second objective, a tendency was found ($P = 0.05$) in terms of differences in cortisol levels between groups. Specifically, cortisol levels in hair tended to be higher in the group of cats that showed behavioural changes related to stress (4.65 ± 1.79 pg/mg) with respect to the control group (4.13 ± 1.28 pg/mg). However, no significant differences were found between the groups in the change in cortisol levels over time ($P = 0.59$). Considering these results, it does not seem that the assessment of cortisol levels in hair is an adequate method for analysing the success of the interventions most commonly used. In addition, hair colour had a significant influence ($P < 0.0001$), which suggests that it is necessary to take this into account when using this methodology.

Finally, it should be noted that, in writing this thesis, important inconsistencies were detected regarding the terminology used in the literature when describing defensive behaviours in threatening contexts. For example, in the specific case of *freezing* there are multiple definitions that vary slightly between different studies. Using one over another could determine the results obtained to some extent. This problem prompted the discussion in the last chapter of this thesis focused on addressing the importance of avoiding biased labels and applying precise definitions. Similarly, the issues that can arise as a result of the widespread presence of anthropomorphism in the field of animal welfare and in the context of clinical ethology were also raised.

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AVP	Arginina-vasopresina
BNST	Núcleo del lecho de la estría terminal
CPFm	Corteza prefrontal medial
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
EIA	Inmunoensayo enzimático
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical
SD	Desviación estándar

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ESTRÉS: ASPECTOS GENERALES

1.1. Definición de estrés

El término estrés está absolutamente integrado en el vocabulario cotidiano de la gente. El hecho de que sea una palabra tan común posiblemente haya desvirtuado en parte su significado. En este sentido, de manera similar a lo que ocurre con otros conceptos vinculados al estudio del comportamiento, existe una dualidad de opiniones con respecto a la idoneidad de emplear en ciencia los mismos términos que son de uso tan frecuente en el lenguaje coloquial. Por un lado, la opinión popular representa en buena medida una ventana a los asuntos que interesan a las personas, por lo que conviene tenerla presente. En consecuencia, hoy día el estrés es considerado uno de los problemas más importantes asociados al estilo de vida actual de los llamados países desarrollados. Sin embargo, por otro lado, debemos ser cuidadosos a la hora de adoptar esta misma terminología para los procesos que estudiamos (Fletcher, 1995).

En relación con esto, se ha intentado establecer un concepto científico de estrés a lo largo del tiempo y desde múltiples disciplinas. Este hecho ha marcado la evolución del concepto, pues se nutre continuamente de los constantes avances neurobiológicos, así como de las ciencias cognitivas. No obstante, uno de los principales problemas en el campo del estudio del estrés ha consistido precisamente en cómo definirlo y, de hecho, todavía hoy existe una amplia discusión sobre esta cuestión (Levine, 2005).

La base de la visión actual del concepto de estrés la proporcionaron Claude Bernard, Walter B. Cannon y Hans Selye. En la segunda mitad del siglo XIX el fisiólogo francés Claude Bernard introdujo el concepto de medio interno, necesario, a su vez, para el desarrollo del término de la homeostasis, descrito por Cannon más de medio siglo después. Este concepto, que hace referencia a los procesos de regulación que mantienen dentro de rangos aceptables las propiedades del medio interno, fue fundamental para el desarrollo ulterior del término estrés (Goldstein, 2007). Además, Cannon introdujo por primera vez el concepto de lucha y huida tras años explorando el papel del sistema nervioso autónomo en el control de la fisiología corporal en circunstancias desafiantes (Brown and Fee, 2002). Tiempo después Selye definió el estrés como “la respuesta no específica del cuerpo frente a cualquier demanda sobre él” (Selye, 1974). Asimismo, describió tres fases de respuesta de estrés incluidas en lo que denominó “Síndrome general de adaptación” (Selye, 1936): la fase de alarma

Introducción general

(movilización de los recursos energéticos del organismo), la fase de resistencia (periodo adaptativo en el que el individuo hace frente al estresor) y la fase de extenuación (agotamiento del organismo).

En este marco, los resultados que obtuvo Selye en sus estudios usando diferentes extractos de tejidos en ratas – en los que sistemáticamente hallaba un incremento del tamaño de la glándula adrenal –, le llevaron a considerar que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal era una de las bases de la respuesta de estrés (Selye, 1956). Como resultado del trabajo de ambos investigadores se estableció que la respuesta de alarma, tal como la denominó Selye, estaba controlada por dos ejes fisiológicos complementarios. Por un lado, el eje simpático-adrenomedular, que involucra al sistema nervioso simpático y, por otro, el eje pituitario-adrenocortical, que implica la liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal.

Posteriormente, una contribución importante al concepto de estrés vino de la mano del neuroendocrinólogo McEwen, quien incorporó el término alostasis. Esta, en contraste con la homeostasis, representa más bien un estado cambiante en el proceso de adaptación del cuerpo ante la exposición a diversos estresores (McEwen, 2000). El coste de mantener esta regulación alostática se denomina carga alostática, que de ser excesiva o prolongada en el tiempo puede conllevar consecuencias patológicas (McEwen and Wingfield, 2003).

No obstante, tal como se señalaba anteriormente, a pesar de los avances conseguidos en el estudio del estrés aún hoy existe discusión al tratar de establecer un concepto científico. Una de las razones por las que resulta complicada esta cuestión es que reamente se está utilizando este término para definir un concepto compuesto y multidimensional (Le Moal, 2007). Este engloba varios componentes, como la información de entrada (el estímulo estresante o estresor), los sistemas de procesamiento (incluyendo la experiencia subjetiva) y la respuesta de estrés, así como la interacción entre ellos (Levine, 2005). En este sentido, gran parte de las definiciones halladas sobre el estrés incluye alguno de estos componentes.

Teniendo en cuenta el marco en el que se desarrolla esta tesis, consideramos que aquellas definiciones de estrés que incluyen el matiz distintivo entre alteración real y potencial son las más apropiadas. Un ejemplo de ello es la definición propuesta por (McEwen, 2007), según la cual el estrés puede definirse como una amenaza real o interpretada para la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en respuestas fisiológicas y de comportamiento. Este matiz de que el daño puede ser real o potencial – en el sentido de que esté ocurriendo en el momento o que pueda ocurrir – es importante para entender la transición del concepto de estrés de tipo físico al que tiene una implicación más emocional. Es decir, permite distinguir entre los estímulos físicos o sistémicos (como

la hipovolemia o la hipoglucemia), que provocan una alteración directa de la homeostasis, y los estímulos emocionales o psicológicos, que provocan una respuesta anticipatoria. De hecho, aunque los estudios clásicos como los de Selye se basaron principalmente en la influencia de estímulos físicos, el trabajo posterior de muchos autores – así como la tendencia actual – se ha focalizado más bien en la importancia de los factores estresantes psicológicos.

1.2. Categorías de estímulos estresantes y respuestas asociadas

Retomando la idea del último párrafo, actualmente la clasificación más aceptada reconoce dos categorías de estímulos estresantes: físicos o sistémicos y emocionales o psicológicos (Kovács et al., 2005). No obstante, cabe indicar que estas categorías no son excluyentes, por lo que también encontramos estímulos que pueden tener tanto un componente físico como emocional.

Conviene tener en cuenta esta cuestión, pues en función del estímulo se encontrarán diferencias tanto en el tipo de respuesta desencadenadas (reactivas versus anticipatorias) (Herman et al., 2003), como a nivel del procesamiento dentro del sistema nervioso central (Pacák and Palkovits, 2001; Kovács et al., 2005). Esta diferencia del procesamiento cerebral entre estímulos sistémicos y emocionales queda claramente ilustrada en un estudio de Li y colaboradores en el que utilizaron *c-fos* como marcador de actividad neuronal (Li et al., 1996). En dicho trabajo evidenciaron que un estímulo fundamentalmente emocional se procesaba en áreas telencefálicas y de ahí la información llegaba a través de una vía descendente al núcleo paraventricular del hipotálamo. Sin embargo, en el caso del estímulo sistémico el procesamiento era radicalmente opuesto, pues primero tenía lugar a nivel del tronco del encéfalo y de ahí se transmitía al núcleo paraventricular. Considerando estas notables diferencias, esta clasificación resulta especialmente útil en investigación para escoger de forma adecuada el modelo con el que trabajar.

Dentro de los estímulos físicos podemos citar desde cambios en señales homeostáticas, como la estimulación de quimiorreceptores por un descenso en los niveles de oxígeno o variaciones en barorreceptores por alteraciones en la presión osmótica de la sangre como consecuencia de una deshidratación, a cambios en señales inflamatorias, como la liberación de citoquinas a la circulación durante un proceso inflamatorio. En definitiva, esta categoría incluye aquellos estresores que provocan una alteración directa de la homeostasis que activa circuitos subcorticales autonómicos y que generan una respuesta adaptativa sin una contribución cortical significativa (Pacák and Palkovits, 2001). Por tanto, este tipo de estímulos desencadenan respuestas reactivas, esto es, generan una reacción frente a una alteración homeostática real.

Introducción general

En cuanto a los estímulos emocionales, en contraposición a los sistémicos, provocan respuestas anticipatorias generadas en ausencia de un desafío fisiológico (Herman et al., 2003). Es decir, en este caso la respuesta se desencadena ante la probabilidad o expectativa de que pueda necesitarse. Lógicamente, este tipo de respuesta anticipatoria supone una ventaja con respecto a la que se genera cuando el daño ya está instaurado. Estas respuestas anticipatorias se producen a través de dos programas: los innatos y los de memoria (mecanismos de condicionamiento) (Herman et al., 2003). Dentro de los estímulos estresantes que generan respuestas anticipatorias a través de programas innatos encontramos ejemplos como la presencia directa o indirecta de un depredador, los espacios abiertos para algunas especies o los entornos novedosos/desconocidos. Cabe señalar que la idoneidad del término innato ha suscitado debate a lo largo de los años (Blumberg, 2017). Debido a que la experiencia afecta a la expresión de lo programado a nivel genético, parece que los límites entre los comportamientos aprendidos y los innatos se han diluido (LeDoux, 2015). De hecho, según algunos autores este término en ningún caso es apropiado en las ciencias del comportamiento actuales (Bateson and Marni, 2007). No obstante, tal como apunta LeDoux (2015), determinados comportamientos son claramente más dependientes que otros de las predisposiciones biológicas dentro de una especie y la posibilidad de que puedan ser aprendidos parece difícil. Un ejemplo que puede encontrarse en el marco de esta tesis es el de la congelación o *freezing*, que forma parte de la respuesta defensiva del individuo frente a las amenazas (LeDoux, 2000). Por tanto, aunque el debate persiste, hoy día son numerosos los autores que han optado por mantener el uso del concepto de innato.

Por otra parte, dentro de las respuestas anticipatorias generadas a través del aprendizaje se encuentran las causadas por mecanismos de condicionamientos clásico. En este tipo de aprendizaje asociativo, descrito por primera vez por Ivan Pavlov, un reflejo innato pasa a estar bajo el control de un nuevo estímulo (Gluck et al., 2007). Dentro del condicionamiento clásico cabe destacar el condicionamiento del miedo (Bouton and Bolles, 1980), en el que un estímulo en origen inocuo se combina con otro aversivo, de manera que se establece una asociación. De esta manera, el estímulo originalmente neutro pasa a ser un estímulo condicionado capaz de provocar una respuesta refleja similar al estímulo aversivo incondicionado. Esta variante del condicionamiento clásico es muy utilizada como herramienta de investigación. En relación con esto, es importante señalar que en los últimos años algunos investigadores han propuesto un cambio de terminología, pasando del concepto de condicionamiento de miedo al de condicionamiento de amenaza (LeDoux, 2014). La autora de esta tesis muestra preferencia esta segunda opción, por lo que en lo que resta de documento se seguirá dicha terminología.

1.3. Respuesta de estrés

Este apartado representa una muy breve descripción del sistema de estrés cuya finalidad consiste principalmente en poner en contexto al lector. No obstante, los factores neuroendocrinos implicados en la respuesta de estrés son complejos y numerosos (Joëls and Baram, 2009) y su explicación detallada se aleja del objetivo de esta tesis.

La exposición a estímulos estresantes, sean sistémicos o emocionales, conlleva la activación de dos sistemas neuroendocrinos fundamentales: el eje hipotalámico-simpático-adrenomedular y el eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) (Romero and Butler, 2007; Habib et al., 2001). La respuesta del eje hipotalámico-simpático-adrenal es inmediata, se produce en cuestión de segundos. Sin embargo, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal es más lento y no se expresa por completo durante minutos o incluso horas (Sapolsky et al., 2000). La activación de estos dos ejes es común a todas las situaciones de estrés y, por tanto, este papel central los sitúa en el punto de mira de las consecuencias patológicas a largo plazo. Por este motivo, la mayoría de los trabajos relacionados con el estrés se han focalizado en estudiar y caracterizar con detalle ambos sistemas neuroendocrinos.

La activación de eje hipotalámico-simpático-adrenomedular provoca una respuesta rápida de la división simpática del sistema nervioso vegetativo que da lugar a la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) (Charmandari et al., 2005). La actividad simpática y las catecolaminas movilizan energía corporal y preparan para la acción. Esto se consigue a través de la inducción de la glucogenólisis hepática, así como del aumento del ritmo cardíaco y la presión sanguínea, lo que incrementa el flujo de sangre a través del sistema circulatorio para favorecer el aporte de energía a los músculos. Esto se corresponde con la clásica respuesta de lucha y huida descrita por Cannon a principios del siglo XX. Sin embargo, las catecolaminas también inhiben procesos que, como la digestión, pueden resultar superfluos durante una situación de emergencia (Romero and Butler, 2007).

Por otra parte, la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical, de reacción más lenta, se inicia en el núcleo paraventricular del hipotálamo. En concreto, cuando un individuo percibe un estresor se provoca la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas hormonas estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la circulación sistémica, que, a su vez, actúa sobre la corteza adrenal induciendo la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol o corticosterona en función de la especie) (Myers et al., 2012). Los glucocorticoides provocan cambios

sustanciales ejerciendo numerosas acciones metabólicas en el organismo, además de desempeñar un importante papel a nivel del sistema cardiovascular, el sistema inmunitario, los procesos inflamatorios, la reproducción y el crecimiento, entre otros (Tsigos and Chrousos, 2002; Romero and Butler, 2007). En relación con esto, Sapolsky y colaboradores distinguen dos clases de acciones de los glucocorticoides: las moduladoras y las preparatorias. Dentro de las acciones moduladoras a su vez proponen una subdivisión: permisivas, supresoras y estimuladoras (Salposky et al., 2000). La categoría de las acciones permisivas se relaciona con las respuestas fisiológicas inmediatas, como los efectos metabólicos que llevan a un aumento de la disponibilidad de energía y el incremento del ritmo cardiaco. Las acciones supresoras se inician al menos una hora después del comienzo de la situación de estrés y aquí se incluyen los mecanismos inhibitorios sobre las respuestas inflamatoria e inmunológica, así como la actividad el propio eje HPA con el objetivo de prevenir las consecuencias negativas de una respuesta exagerada o sostenida. Por su parte, las acciones estimuladoras ocurren de igual modo con demoras de al menos una hora y actúan amplificando las respuestas del organismo al estrés. Por último, las acciones preparatorias son aquellas que no están involucradas en la respuesta inmediata, sino que modulan la respuesta del organismo a un estresor posterior. Con lo cual serán de especial relevancia al valorar los efectos a largo plazo de la exposición a situaciones estresantes.

Volviendo a la definición de estrés de Selye citada anteriormente, uno de los aspectos que ha generado mayor debate en este campo es lo referente a la inespecificidad de la respuesta frente a las diversas situaciones. Actualmente algunos autores proponen que la exposición de un organismo a un estresor sistémico puede provocar dos tipos de respuestas fisiológicas (Armario, 2006). Por un lado, una específica frente al estímulo particular y no relacionada con las propiedades estresantes del mismo y, por otro lado, una respuesta no específica común a todos los estímulos estresantes. De forma que de primeras se desencadenaría una respuesta homeostática específica adecuada para cada situación concreta y solo en el caso de que dicha situación no pudiera resolverse con los mecanismos homeostáticos normales, entonces se dispararía la respuesta no específica. Esta última, que representaría lo que de forma habitual se denomina respuesta de estrés, incluiría tanto al eje hipotalámico-simpático-adrenomedular como al eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical. De tal manera que la valoración de la respuesta fisiológica en una situación determinada podría constituir la suma de ambos tipos de respuesta: la específica y la inespecífica.

Por otra parte, los estímulos de tipo emocional aparentemente muestran un patrón más similar (Armario, 2006; Pacák and Palkovits, 2001). Por tanto, hoy por hoy no parecen existir características fisiológicas fiables de especificidad emocional.

2. FACTORES QUE MODULAN LA RESPUESTA DE ESTRÉS

Las situaciones estresantes forman parte de la vida de los organismos y la respuesta de estrés proporciona mecanismos para afrontar dichas situaciones. En consecuencia, el estrés no debe considerarse como algo inherentemente negativo. Cuando el individuo que se enfrenta a la situación estresante no puede adaptarse con éxito, así como afrontar o habituarse al estresor, el estrés pasa a ser una circunstancia perjudicial (Moberg, 2000).

Existen una serie de variables que modulan la respuesta de estrés y que determinan en buena medida el impacto negativo de la exposición a un estímulo estresante. Algunos de estos factores están relacionados con las características particulares del estímulo estresante y otros con las características propias del animal (Armario, 2006).

2.1. Características del estímulo estresante

2.1.1. Intensidad del estímulo estresante

En principio, lo esperable es que las consecuencias fisiológicas y patológicas de los factores estresantes estén relacionadas con su intensidad. Afortunadamente, esta es una variable relativamente fácil de controlar para su estudio a nivel de laboratorio. De hecho, hay autores que discriminan entre los parámetros fisiológicos y conductuales sensibles a determinados estímulos estresantes (marcadores de estrés) y aquellos que responden proporcionalmente a la intensidad del estresor (marcador de intensidad de estrés) (Armario et al., 1986). Esta discriminación es importante considerarla a la hora de analizar variables, pues, aunque existen un gran número de ellas sensibles al estrés, pocas pueden considerarse marcadores de intensidad.

2.1.2. Duración de la situación de estrés

Las consecuencias del estrés también dependen de la duración de la exposición a los estresores (agudo versus crónico). Generalmente se considera que el estrés agudo supone una exposición relativamente breve a un único estresor, lo que permitiría que la respuesta de estrés pudiera responder de forma adecuada. Por el contrario, tradicionalmente se ha considerado que el estrés crónico representa una amenaza para el organismo por sobrecarga homeostática (Romero et al., 2009) debido a la elevada demanda de recursos biológicos (Moberg, 2000).

2.1.3. Controlabilidad

El control es una importante variable en la modulación de la respuesta de estrés. La falta de control (*uncontrollability*) se produce cuando la probabilidad de un evento concreto no cambia, con independencia de las acciones que el individuo desarrolle (Seligman et al., 1971). Esta incapacidad para influir sobre el curso de la situación estresante es un factor destacado en la aparición de los efectos negativos del estrés y en la capacidad posterior del individuo para escapar o evitar dicha situación en el futuro. Con respecto a esto, Seligman y Maier fueron pioneros en el estudio de la pérdida de control ante la exposición de estresores y la aparición de indefensión aprendida (Maier and Seligman, 1976). El modelo animal de indefensión aprendida es adecuado para distinguir los efectos nocivos del estímulo estresante en sí (como un choque eléctrico) de los efectos del control sobre la situación de estrés. Lo que se ha observado en este modelo es que los animales sometidos a choques eléctricos inescapables muestran problemas para aprender posteriormente una tarea de escape, lo que no ocurre con los individuos que sí pueden controlar la aparición del estresor mediante una acción determinada. En este marco, hay estudios que incluso sugieren que el control de las situaciones mediante comportamiento activo sería más efectivo que la extinción a la hora de evitar que el estímulo amenazante desencadenara de nuevo reacciones defensivas mediante los fenómenos de recuperación espontánea y de reinstauración (Amorapanth et al., 2000).

2.1.4. Predictibilidad

Otra variable que modula marcadamente la respuesta de estrés es la capacidad de predecir lo que va a ocurrir (Weinberg and Levine, 1980; Koolhaas et al., 2011). Son numerosos los estudios que demuestran la preferencia de los animales por los estímulos aversivos predecibles (Mineka and Kihlstrom, 1978; Fanselow, 1980), el impacto de los eventos estresantes impredecibles (Weiss, 1970; Mineka and Hendersen, 1985), así como la reducción de los efectos del estrés a través de la predictibilidad (Seligman et al., 1971; Foa et al., 1992). En este contexto, las medidas que habitualmente se utilizan para examinar los efectos de la predictibilidad en contextos aversivos incluyen la valoración del eje HPA, los efectos sobre la salud física (ulceración gástrica y anorexia) y las pruebas de preferencia (Bassett et al., 2007). En relación con las consecuencias de los eventos estresantes impredecibles, el grado de ulceración gástrica parecer ser la variable más sensible para discriminar entre un choque eléctrico predecible y uno impredecible (Abbott et al., 1984). Sin embargo, la activación diferencial del eje HPA en función del grado de predictibilidad parece ser más controvertida (Armario, 2006). Por otra parte, los sistemas neuronales implicados en las respuestas

ante estímulos aversivos predecibles e impredecibles parecen ser distintos, a pesar de haber superposición entre ellos (Davis, 2006).

No obstante, cabe indicar que con frecuencia la capacidad de predecir por sí sola no permite evitar el estresor, más bien consigue cambiar su percepción (Sapolsky, 2004). En este sentido, algunos autores sugieren que la relación entre la controlabilidad y la predictibilidad es tan estrecha que la comprensión total de uno de estos factores depende de la del otro (Mineka and Hendersen, 1985). Por su parte, otros consideran la controlabilidad y la predictibilidad como términos centrales en la definición de estrés (Koolhaas et al., 2011). En cualquier caso, ambos factores han adquirido un especial protagonismo en la investigación, en parte posiblemente porque influyen en las estrategias de afrontamiento de los individuos para tratar de reducir el impacto de la situación estresante.

En otro orden de ideas, el hecho de que las situaciones ambiguas puedan ser más estresantes no siempre se tiene en cuenta en el contexto de la etología clínica. Tal y como algunos autores sugieren, es posible que los tratamientos clásicos de determinados problemas de comportamiento frecuentes de los animales domésticos no estén en concordancia con la teoría del estrés (Amat et al., 2014).

2.1.5. Incertidumbre

Esta variable hace referencia a la probabilidad de que un evento ocurra. La incertidumbre y la imprevisibilidad son muy similares y con frecuencia se utilizan indistintamente. No obstante, son conceptos con connotaciones ligeramente diferentes. Entre otras cuestiones, el de la incertidumbre incluye aspectos subjetivos de la experiencia fenoménica del individuo, por lo que aparece con más frecuencia en la literatura sobre la ansiedad humana. Por su parte, la imprevisibilidad se utiliza más comúnmente en estudios controlados de laboratorio (Grupe and Nitschke, 2013).

2.2. Características propias del animal

Los diferentes sistemas biológicos son complejos y tienden inexorablemente a la variación entre los individuos de una misma especie. Concretamente, el concepto de las diferencias individuales hace referencia a las variaciones en el comportamiento que caracterizan a los individuos y que los distinguen de otros de su misma especie, que se mantienen en el tiempo y en los contextos y que no se pueden atribuir simplemente a la edad o el sexo (Manteca and Deag, 1993). La investigación sobre esta variabilidad comportamental entre los individuos ha despertado gran interés y ha generado

Introducción general

numerosos trabajos en distintos ámbitos, incluyendo la producción animal, el bienestar y la conservación, estudios de farmacología, del comportamiento de riesgo y de la respuesta al estrés (Boissy and Bouissou, 1995; Caspi et al., 1997; Carlstead et al., 1999; Gartner and Powell 2012; Boyce and Ellis, 2005; Ellis et al., 2006; McDougall et al., 2006). En este sentido, conviene señalar que en el estudio de las diferencias de comportamiento se ha utilizado diferente terminología: personalidad animal (Dingemanse and Réale, 2005; Bell, 2007b), temperamento (Manteca and Deag, 1993; Réale et al., 2007), estilos de afrontamiento (Koolhaas et al., 1999) y síndromes de comportamiento (Sih et al., 2004; Bell, 2007a). La distinción entre estos términos es vaga y con frecuencia se utilizan de forma análoga.

En relación con el estrés, está ampliamente reconocido que los individuos muestran una variabilidad considerable, tanto en la respuesta fisiológica a los estímulos estresantes como en la conductual (Mormède et al., 2007; Koolhaas et al., 2007). Y, de hecho, algunos autores han apuntado a la importancia de las estrategias de afrontamiento (*coping styles*) – así como a la existencia de variabilidad individual en dichas estrategias – en la influencia de la activación del eje HPA en respuesta al estrés (Lazarus, 2000). De forma general se han descrito dos tipos de estilos de afrontamiento: los proactivos y los reactivos, caracterizados por el uso de estrategias activas o pasivas, respectivamente, para enfrentar la situación (Koolhaas et al., 1999). La evitación activa puede generar tanto efectos beneficiosos como patológicos y parece que la controlabilidad sería el factor que decantara la balanza en uno u otro sentido (LeDoux et al., 2017). En este aspecto, cabe destacar que en los últimos años se ha incrementado el foco de atención sobre las estrategias de afrontamiento activas como parte de las intervenciones efectivas en los problemas relacionados con el estrés y la ansiedad (Cain and LeDoux, 2007; Boeke et al., 2017).

Esta variabilidad individual en la respuesta de estrés es el resultado de la interacción de factores genéticos (Kloet et al., 2005) y ambientales, en especial las experiencias en etapas tempranas del desarrollo (Seckl and Meaney, 2004; Francis et al., 1999). Con relación a esto último, Levine demostró en un estudio clásico que las crías de rata a las que se separaba brevemente de la madre mostraban una menor reactividad frente al estrés en la edad adulta (Levine, 1957). Este efecto parecía estar causado por el incremento del cuidado maternal que recibían las crías al regresar (Francis et al., 1999; Meaney, 2001).

Por otra parte, esta variabilidad también se manifiesta en diferencias individuales en la vulnerabilidad al estrés (Ebner and Singewald, 2017) y a las patologías mediadas por el sistema inmunitario (Koolhaas, 2008).

3. CONSECUENCIAS & EFECTOS DEL ESTRÉS

3.1. Estrés como factor de riesgo de numerosas enfermedades

El posible impacto patológico de las hormonas del eje HPA es más extenso que el de las del eje hipotalámico-simpático-adrenomedular, lo que explica que la investigación se haya focalizado fundamentalmente en este sistema. De todas formas, más allá del énfasis que se suele mostrar con respecto a las consecuencias aversivas del estrés, hay que recordar que las respuestas a los estresores agudos generalmente son adaptativas y potencialmente vitales para la supervivencia de los individuos (Hollon et al., 2015).

En cualquier caso, los glucocorticoides suelen representar en la mente de la gente el papel principal en cuanto a los efectos negativos del estrés. Y, de hecho, es cierto que están asociados a buena parte de estos efectos negativos cuando las respuestas son exageradas o duraderas. Aun así, conviene matizar que los glucocorticoides cumplen una función fundamental. En este sentido, Munck y colaboradores ya señalaron hace varias décadas que la función fisiológica de los aumentos en los niveles de glucocorticoides inducidos por el estrés no consiste en actuar frente a la fuente de estrés en sí. Es decir, tienen poco que ver con la respuesta inicial que se activa frente a la situación estresante. Su función consistiría más bien en actuar frente a las reacciones de defensa normales activadas por el estrés, restaurando, por tanto, las alteraciones provocadas por la respuesta inicial (Munck et al., 1984). En relación con esto, hay que señalar que en la naturaleza normalmente las situaciones de estrés suelen ser de corta duración, esto es, más bien puntuales en cuanto al tiempo que se mantienen (Sapolsky, 2004). Con lo cual, en este contexto, la liberación de glucocorticoides sería igualmente puntual. Las situaciones en las que dicha liberación se produce de forma masiva o prolongada en el tiempo estarían asociadas a contextos relacionados de forma directa o indirecta con el modo de vida actual. Y este hecho se extendería también a los animales que viven en condiciones ambientales creadas por el ser humano (zoológicos, granjas, laboratorios, etc.). En estos ambientes – tan diferentes a los programados biológicamente – posiblemente el efecto negativo de los glucocorticoides predomina, decantando la balanza hacia las consecuencias adversas (Chrousos, 2009).

Actualmente se sabe que la activación crónica de la respuesta de estrés constituye un factor de riesgo para numerosas enfermedades – además de exacerbar las ya preexistentes –, como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes, las alteraciones reproductivas y los trastornos afectivos (Sapolsky et al.,

2000). Curiosamente, aunque el impacto del estrés en la salud humana está ampliamente reconocido, esto mismo está poco estudiado en medicina veterinaria (Mills et al., 2014). De todas formas, en determinadas patologías como la cistitis idiopática está ampliamente documentado el papel del estrés como factor desencadenante (Cameron et al., 2004; Westropp and Buffington, 2004; Buffington et al., 2006; Defauw et al., 2011). La cistitis idiopática es la causa más frecuente dentro de los problemas que afectan a las vías urinarias inferiores en gatos y es una patología con un importante componente de dolor (Forrester and Towell, 2015). De igual modo, la anorexia en esta especie puede ser debida a una respuesta de estrés y constituye un problema potencialmente grave (Dimski and Taboada, 1995). Además, los gatos con niveles de estrés elevados podrían tener una mayor propensión a desarrollar infecciones del tracto respiratorio superior (Tanaka et al., 2012). Por otra parte, algunas patologías dermatológicas parecen estar afectadas por el estrés (Virga, 2003), así como diversos problemas gastrointestinales (Enck, 1992).

3.2. Estrés y sistema inmunitario

La respuesta de estrés y la respuesta inmunológica parecen tener un origen común y esto explica que haya una correlación bastante evidente en la regulación al alza de ambos sistemas. Los mecanismos de la respuesta de estrés pudieron haberse desarrollado inicialmente como respuestas de defensa local a estímulos ambientales nocivos. A medida que el sistema nervioso fue incrementando su complejidad ambos sistemas pudieron ir disociándose. De modo que cada uno fue especializándose de forma más específica en determinadas funciones (Ottaviani and Franceschi, 1998; Black, 2003), pero continuaron funcionando de manera integrada.

A este respecto, los glucocorticoides y las catecolaminas influyen en la función de los leucocitos y las células inmunitarias accesorias. Asimismo, suprimen la secreción de citoquinas proinflamatorias y a la inversa, es decir, dichas citoquinas estimulan el sistema de estrés aumentando los niveles de glucocorticoides, suprimiéndose, por tanto, la respuesta inflamatoria y evitando así un exceso de activación de esta (Chrousos, 2009). En situaciones de estrés crónico esta disfunción del sistema inmunológico puede incrementar el riesgo de padecer infecciones y ciertos trastornos autoinmunes (Elenkov and Chrousos, 1999; Chrousos, 2000; Romero and Butler, 2007).

3.3. Efectos del estrés sobre el sistema nervioso central

3.3.1. Estrés ambiental perinatal

Son numerosos los estudios en diferentes especies que señalan que el hecho de que las madres experimenten estrés durante la gestación puede producir alteraciones en la fisiología y en la conducta de las futuras crías (Weinstock, 2008; Del Giudice, 2012; Herpfer et al., 2012). Uno de los mecanismos que subyacen a estos efectos prenatales del estrés es la respuesta del eje HPA del feto, que incrementa sustancialmente los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotropa debido al aumento sostenido de los glucocorticoides de la madre. Por otra parte, el cuidado maternal alterado también puede turbar el desarrollo de la descendencia. Con el objetivo de discernir el efecto del estrés ambiental prenatal del de la conducta de la madre, en un estudio llevado a cabo por Del Cerro y colaboradores utilizaron un diseño de cruce de camadas o adopción temprana (Del Cerro et al., 2010). Este diseño básicamente consiste en intercambiar las camadas de las madres estresadas a las no estresadas – y viceversa – justo tras el nacimiento. Un interesante resultado que obtuvieron fue que las hijas de las madres estresadas que habían sido criadas por madres no estresadas mostraban en la edad adulta respuestas maternas similares a las de las hijas de las madres no estresadas que no habían sido cruzadas (es decir, que habían sido criadas por sus propias madres). Estos hallazgos sugerían que los efectos del cruce de camadas habían compensado de algún modo los cambios hormonales y cerebrales provocados por el estrés gestacional de la madre. Por tanto, los investigadores pudieron concluir que el cuidado materno adecuado durante el desarrollo temprano de las crías podía contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés ambiental prenatal.

En definitiva, las experiencias durante la vida postnatal temprana también pueden generar diferencias en la respuesta de estrés de los individuos a largo plazo. Tal como se acaba de apuntar, las variaciones en las interacciones materno-filiales durante estas etapas tempranas pueden modular una amplia variedad de comportamientos, en parte debido a modificaciones que se producen en eje HPA (Cameron et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado en ratas que la estimulación táctil temprana mejora las funciones motoras y cognitivas en la edad adulta del individuo. Asimismo, provoca cambios a nivel cerebral como, por ejemplo, un incremento en la longitud dendrítica y en la densidad de espinas en la corteza prefrontal medial (Richards et al., 2012). Incluso parece que la intervención temprana con estimulación táctil después de una lesión cortical mejora la recuperación impulsando cambios plásticos a nivel de la corteza (Kolb and Gibb, 2010).

3.3.2. Aprendizaje y memoria

El estrés muestra dos caras en cuanto a su efecto sobre el aprendizaje y la memoria, mermando en ocasiones estas capacidades y estimulándolas en otras. Además, puede afectar a todas las fases en las que se construye la memoria (codificación, consolidación, recuperación y reconsolidación) (Schwabe et al., 2012). En este aspecto, se ha sugerido que cuando el agente estresante no está vinculado con el contexto de aprendizaje, ni ajustado en el tiempo con el evento que debe recordarse, perjudica los procesos mnésicos (Joëls et al., 2006).

En situaciones altamente estresantes el cortisol liberado puede provocar alteraciones a nivel del hipocampo y generar amnesia con respecto al propio evento (Shors, 2006; Kim et al., 2006; Roozendaal et al., 2009). En este sentido, la mayoría de los estudios encuentran que las experiencias estresantes se asocian con déficits en la recuperación de la información, pero no en el aprendizaje en sí (Shors, 2006). Sin embargo, esas mismas hormonas son las que potencian, por ejemplo, el condicionamiento de amenaza a nivel de la amígdala (Rodrigues et al., 2009; Roozendaal et al., 2009). A este respecto, cabe señalar que existe una amplia evidencia que indica que en las experiencias emocionalmente intensas las acciones sinérgicas de la adrenalina y los glucocorticoides regulan la consolidación de la memoria (Roozendaal and McGaugh, 2011; McGaugh, 2015). En este marco, la mayor parte de la investigación sobre la modulación emocional de la memoria está realizada en roedores y humanos. Con todo, encontramos algún trabajo en perros que parece sugerir una mejora en la memoria como efecto de la actividad lúdica utilizada como evento excitante posterior a la situación de aprendizaje (Affenzeller, 2017).

4. IMPLICACIONES DEL ESTRÉS EN ETOLOGÍA CLÍNICA

4.1. Problemas de comportamiento asociados

Las especies domésticas como el perro y el gato están expuestas en su día a día a numerosas circunstancias que pueden generarles estrés de forma puntual o mantenida en el tiempo. Y concretamente el gato especialmente vulnerable a este tipo de situaciones. Algunas de las principales causas que generan estrés en esta especie incluyen los cambios en el entorno, los ambientes empobrecidos, la relación entre el gato y las personas con las que convive, los conflictos entre gatos, así como la falta de control y previsibilidad (Amat et al., 2016).

Por otra parte, muchos de los problemas de comportamiento que se tratan en la especialidad de etología clínica llevan asociada una respuesta de estrés (Manteca, 2003). En este aspecto, parece existir una relación evidente entre los trastornos compulsivos y el estrés (Landsberg et al., 2003; Luescher, 2003), así como en el caso de la conducta de marcaje con orina, que puede aumentar en circunstancias estresantes para el animal (Hart and Hart, 2014). Asimismo se ha sugerido dicha relación con la coprofagia, pues en concreto en perros se ha demostrado experimentalmente un incremento de esta conducta en situaciones de estrés crónico (Beerda et al., 1999). Además, las circunstancias que generan estrés parecen incrementar algunas formas de agresividad (Blanchard and Blanchard, 2006; Kruk et al., 2004).

4.2. Limitación de la eficacia de las terapias conductuales

El estrés no solo favorece el desarrollo de numerosos problemas de comportamiento, sino que también puede dificultar la aplicación de las medidas terapéuticas, así como contribuir a una evolución más pobre de los casos. Por un lado, como se mencionaba anteriormente, las experiencias estresantes o emocionalmente excitantes generan memorias intensas y difíciles de modificar por su efecto sobre el proceso de consolidación (Roosendaal and McGaugh, 2011). Y estas experiencias emocionalmente significativas pueden aparecer con relativa frecuencia en el día a día de los animales domésticos. Por ejemplo, en las interacciones mal resueltas con las personas o con otros animales, así como en cuestiones cotidianas como ir a la clínica veterinaria.

Por otro lado, el estrés puede complicar la aplicación de ciertos procedimientos que se utilizan en etología clínica, como la extinción. Este proceso normalmente hace referencia al debilitamiento de la respuesta a un estímulo, el cual adquirió propiedades aversivas a través de mecanismos de condicionamiento (Myers and Davis, 2002). En la extinción, mediante la exposición repetida al estímulo condicionado en ausencia del incondicionado, se genera un aprendizaje nuevo capaz de inhibir la memoria original de la asociación entre el estímulo condicionado y el incondicionado (Sotres-Bayon et al., 2006). La corteza prefrontal medial (CPFm), especialmente su región ventromedial, está implicada en la regulación a nivel de la amígdala de los cambios que se producen durante la extinción (Morgan et al., 1993; Quirk and Beer, 2006; Kim et al., 2011). Precisamente se piensa que las consecuencias del estrés sobre este proceso se deben al efecto de los glucocorticoides sobre la función de la corteza prefrontal ventromedial (Diorio et al., 1993; Radley et al., 2006). En concreto, Izquierdo y colaboradores demostraron que la exposición a una situación estresante incontrolable (natación forzada) – previa al procedimiento del condicionamiento de amenaza –

retrasaba el aprendizaje de extinción con respecto a los controles y además provocaba una retracción significativa de las dendritas en la región infralímbica de la CPFm (Izquierdo et al., 2006). Por su parte, en otro estudio también encontraron que la restricción de una semana afectaba a la memoria de extinción (Miracle et al., 2006).

5. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS

Según Andrew Steptoe los efectos del estrés se manifiestan en cuatro dominios: la fisiología, el comportamiento, la experiencia subjetiva y la función cognitiva (Steptoe, 2007). A continuación se describen cada uno de ellos.

5.1. Respuesta fisiológica

Tal y como se describió previamente, la respuesta al estrés desde la perspectiva fisiológica incluye las alteraciones del sistema neuroendocrino, el sistema nervioso autónomo y el inmunológico. Actualmente, el indicador fisiológico más utilizado para valorar la respuesta de estrés es la concentración de glucocorticoides como representación de la activación del eje HPA (principalmente cortisol en perro y gato). Sin embargo, la valoración de este parámetro muestra complicaciones, puesto que su incremento puede estar relacionado con situaciones que no perjudican el bienestar del individuo, como las conductas de juego o el comportamiento sexual, entre otras (Broom and Johnson, 1993; Otovic and Hutchinson, 2015). Además, la secreción de glucocorticoides muestra un importante dinamismo asociado a un ritmo circadiano, observándose niveles más elevados coincidiendo con el inicio de la actividad (diurno en humanos y nocturno en animales como los roedores) (Lightman and Conway-Campbell, 2010). Por otro lado, la fisiología de la respuesta del estrés presenta una gran variabilidad entre especies e incluso entre individuos de la misma especie (Cockrem, 2013). Aun así, a pesar de estas dificultades, el análisis de la actividad del eje HPA sigue siendo actualmente una de las mejores formas de evaluar el estrés.

5.1.1. Matrices para detectar el cortisol

La concentración de glucocorticoides puede medirse en diferentes matrices biológicas, como el plasma, la saliva, las heces o el pelo. En el análisis comparativo de las diferentes matrices destacan ya no solo cuestiones prácticas, sino también diferencias en el monitoreo de la respuesta de estrés, pues representan la actividad del eje HPA en diferentes periodos de tiempo (Mormède et al., 2007). Por

ejemplo, tanto la medición en sangre como en saliva permiten valorar cambios agudos en los niveles de cortisol, pero no representarían medidas válidas de estrés crónico (Cook, 2012). Por su parte, la cuantificación de los metabolitos del cortisol en heces supondría una situación intermedia, ya que representa un reflejo de la cantidad total de cortisol excretada en un lapso que oscila entre unas horas y más de un día (Möstl and Palme, 2002). En el caso del pelo y las plumas, estas matrices permiten la valoración del estado de estrés a largo plazo (Russell et al., 2012; Talló, 2016).

A pesar de que el plasma es el tipo de muestra más utilizada, presenta diversos problemas a nivel metodológico. Entre otras cuestiones, la concentración plasmática de glucocorticoides muestra una gran variación debido a los ritmos circadianos (Mormède et al., 2007), lo que puede complicar las comparaciones entre muestras obtenidas en diferentes momentos del día. Asimismo, los niveles de glucocorticoides en plasma son especialmente sensibles a factores ambientales, como el propio procedimiento necesario para la obtención de la muestra (Beerda et al., 1996; Willemse et al., 1983).

Por otro lado, la valoración de glucocorticoides mediante la recolección de saliva puede ser menos invasiva que la toma de muestra de sangre y, al igual que esta, se puede utilizar para evaluar el estrés agudo (Mormède et al., 2007). No obstante, también se ve afectada por el ritmo circadiano, a lo que hay que añadir la posible contaminación de la sangre de la cavidad oral, que puede dar niveles engañosamente elevados (Inder et al., 2012).

Tanto la sangre como la saliva entrarían dentro del concepto de matrices de un solo punto (Talló, 2016). Es decir, constituyen matrices cuyas concentraciones de cortisol representan un momento concreto de actividad del eje HPA. Las intermedias, como las heces, la orina o la leche acumulan cortisol circulante, por lo que su valoración representa la actividad del eje HPA durante un lapso determinado. En concreto, la recolección de heces para analizar los metabolitos de cortisol es un método no invasivo muy utilizado para la evaluación del estrés en diferentes especies (Möstl et al., 1999; Schatz and Palme, 2001; Möstl et al., 2002).

Finalmente, las matrices acumulativas, como el pelo o las plumas, han ganado protagonismo en los últimos años. Su principal ventaja es que los valores de cortisol son representativos de la actividad del eje HPA a largo plazo (Russell et al., 2012; Talló, 2016). Además, son matrices cómodas en cuanto al almacenamiento, pues no requieren condiciones especiales (Gow et al., 2010). Por otra parte, aunque la recolección de este tipo de muestra no genera dolor en los animales y no es especialmente invasiva, sí podría producirse una situación de estrés debido a la restricción de movimiento. En cualquier caso, las concentraciones de cortisol no se ven influenciadas por el estrés generado durante el proceso de muestreo (Koren et al., 2002).

5.2. Comportamiento

Cuando los organismos se enfrentan a situaciones de estrés, aparte de su fisiología, también ajustan su comportamiento para afrontarlas. Por tanto, este representa otro dominio en el que se manifiesta el estrés. Con frecuencia se valoran medidas del comportamiento espontáneo de los animales para evaluar las tendencias de acción en situaciones estresantes o emocionalmente excitantes (Paul et al., 2005). En relación con esto, las estrategias de afrontamiento hacen referencia a los esfuerzos del individuo para resolver la situación de estrés (Korte et al., 2005). Tal y como se mencionó anteriormente, de forma general se han descrito dos estilos: el afrontamiento activo y el pasivo. A grandes rasgos – y desde un punto de vista comportamental – las estrategias de afrontamiento activas se caracterizan por un nivel de agresión elevado e intentos activos para contener o evitar el estímulo estresante. Por el contrario, las estrategias de afrontamiento pasivas implican más bien inmovilidad y bajos niveles de agresión (Koolhaas et al., 1999). El predominio de un tipo de estrategia u otro está determinado en gran medida por el propio organismo – existiendo, por tanto, una gran variabilidad individual – y por el tipo de evento estresante (si es inescapable y la posibilidad de control, entre otras cuestiones) (Dantzer, 2016).

Además de las medidas de comportamiento espontáneo, se han utilizado de forma habitual pruebas conductuales que permiten estandarizar las condiciones experimentales. De hecho, este tipo de pruebas constituyen el método más objetivo para evaluar el comportamiento de los individuos en situaciones de estrés y se han usado ampliamente en diferentes especies (Forkman et al., 2007).

Desde el punto de vista del bienestar animal, la observación de los cambios en el comportamiento de los animales puede utilizarse como método no invasivo para evaluar los efectos del estrés. Los indicadores que suelen emplearse para valorar este aspecto incluyen la aparición de comportamientos anormales, como las estereotipias o la apatía, así como las alteraciones en la frecuencia, duración o intensidad de los comportamientos normales, como cambios en la ingesta de alimentos y en el juego o en los comportamientos agresivos y afiliativos, entre otros (Manteca et al., 2016). No obstante, el análisis del comportamiento no está exento de complicaciones, como, por ejemplo, la alta variabilidad individual y la dificultad en la interpretación que puede llevar a posibles sesgos entre evaluadores (Rushen, 2000).

5.3. Experiencia subjetiva

Las experiencias subjetivas hacen referencia a las experiencias privadas que experimentan los individuos. Debido a que no pueden observarse de forma directa, parte de la comunidad científica descarta su utilidad en la investigación. Sin embargo, en investigación humana este problema metodológico es solventado en cierta medida gracias a los informes verbales (Frith et al., 1999). Es decir, las personas pueden explicar en qué consisten sus experiencias mentales. La falta de estos reportes dificulta la verificación de las experiencias subjetivas en los animales. El hecho de buscar estas experiencias en especies no verbales implicaría aceptar que parte del comportamiento del animal representaría un equivalente al informe verbal de una persona y esto, sin duda, supondría un salto especulativo importante. En cualquier caso, la valoración sobre las experiencias subjetivas de los animales debe sustentarse sobre una metodología rigurosa que evite la interpretación sesgada de los resultados. En este sentido, Heyes señala la frecuente carencia de hipótesis alternativas bien definidas y verificables en los estudios que indagan sobre estas cuestiones (Heyes, 2015).

5.4. Función cognitiva

El estudio de las manifestaciones del estrés a nivel de la función cognitiva abarca una amplia variedad de procesos y se ha revisado desde diferentes disciplinas, proporcionando en ocasiones resultados contradictorios (Mendl, 1999). Debido a la complejidad de este asunto, se considerarán únicamente algunos aspectos básicos y se describirán tangencialmente las alteraciones generales sobre los dos sistemas más estudiados: la memoria y la atención.

Una respuesta esperable frente a un estímulo amenazante consiste en que el individuo centre la atención en la búsqueda del origen de dicho estímulo. Y, de hecho, efectivamente la detección de amenazas provoca una mayor sensibilidad al entorno a través de un aumento de la atención y de la vigilancia. Este efecto en parte es consecuencia de la puesta en marcha de los sistemas de activación cerebral a través del núcleo central de la amígdala (Davis and Whalen, 2001). En investigación animal los niveles del comportamiento de vigilancia se han valorado generalmente en base al estado de alerta general y la exploración visual (Paul et al., 2005). No obstante, cabe señalar que la amígdala también procesa estímulos apetitivos (Holland and Gallagher, 1999), por lo que esto se puede traducir en un incremento del comportamiento de vigilancia en contextos no aversivos. Por otra parte, este desvío atencional en presencia de amenazas resulta en un empobrecimiento del

desempeño de otras tareas (Mendl, 1999), aunque realmente este tipo de pruebas controladas con respecto a las funciones cognitivas se han empleado más en investigación humana.

Por último, señalábamos previamente que varias de las hormonas liberadas durante las situaciones de estrés se relacionan tanto con la mejora como con la reducción en las capacidades mnésicas. Además se sabe que la percepción del individuo puede ser determinante para experimentar algo como una amenaza y, por tanto, ser considerado un factor estresante. Esto enfatiza la necesidad de considerar los aspectos cognitivos y perceptivos del estrés, en cuanto al procesamiento de la información ambiental, más allá de las respuestas conductuales y fisiológicas. Woodson y colaboradores ilustraron esta idea en un estudio en el que utilizaron la exposición a un depredador y a una hembra sexualmente receptiva para provocar la activación del eje HPA en ratas macho. Encontraron un aumento equivalente en los niveles séricos de corticosterona en ambas situaciones, pero únicamente las ratas expuestas a los gatos mostraban una correlación significativa entre los niveles de corticosterona y la afectación de la memoria de trabajo dependiente del hipocampo (Woodson et al., 2003). De todas formas, la valoración del rendimiento de la memoria como indicador de estrés puede resultar a veces complicada. Entre otras cosas, debido a que la modulación emocional de la memoria se puede producir también en contextos no aversivos, como, por ejemplo, ante estímulos sexuales o aquellos relacionados con la alimentación.

En conclusión, la presencia de cualquiera de las manifestaciones descritas en los apartados anteriores de forma aislada no es evidencia directa de estrés (Armario, 2006). Por tanto, con el objetivo de asegurar una correcta evaluación de este, lo ideal es analizar siempre varios indicadores (Moberg and Mench, 2000).

6. REFERENCIAS

- Abbott, B. B., Schoen, L. S., & Badia, P. (1984). Predictable and unpredictable shock: Behavioral measures of aversion and physiological measures of stress. *Psychological Bulletin*, *96*(1), 45–71. doi: 10.1037/0033-2909.96.1.45
- Affenzeller, N., Palme, R., & Zulch, H. (2017). Playful activity post-learning improves training performance in Labrador Retriever dogs (*Canis lupus familiaris*). *Physiology & Behavior*, *168*, 62–73. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.10.014

- Amat, M., Camps, T., Le Brech, S., & Manteca, X. (2014). Separation anxiety in dogs: the implications of predictability and contextual fear for behavioural treatment. *Animal Welfare*, *23*(3), 263–266. doi: 10.7120/09627286.23.3.263
- Amat, M., Camps, T., & Manteca, X. (2016). Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *18*(8), 577–586. doi: 10.1177/1098612x15590867
- Amorapanth, P., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2000). Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nature Neuroscience*, *3*(1), 74–79. doi: 10.1038/71145
- Armario, A. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *5*(5), 485–501. doi: 10.2174/187152706778559336
- Armario, A., Lopez-Calderón, A., Jolin, T., & Castellanos, J. (1986). Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sciences*, *39*(5), 471–475. doi: 10.1016/0024-3205(86)90527-8
- Bassett, L., & Buchanan-Smith, H. M. (2007). Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Applied Animal Behaviour Science*, *102*(3-4), 223–245. doi: 10.1016/j.applanim.2006.05.029
- Bateson, P., & Mameli, M. (2007). The innate and the acquired: Useful clusters or a residual distinction from folk biology? *Developmental Psychobiology*, *49*(8), 818–831. doi: 10.1002/dev.20277
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, *30*(3), 272–279. doi: 10.1006/hbeh.1996.0033
- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*, *66*(2), 233–242. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00289-3
- Bell A. M. (2007a). Future directions in behavioural syndromes research. *Proceedings. Biological sciences*, *274*(1611), 755–761. doi:10.1098/rspb.2006.0199

Introducción general

- Bell, A. M. (2007b). Evolutionary biology: animal personalities. *Nature*, *447*(7144), 539–540. doi:10.1038/447539a
- Black, P. H. (2003). The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain, Behavior, and Immunity*, *17*(5), 350–364. doi: 10.1016/s0889-1591(03)00048-5
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2006). Stress and aggressive behaviors. In: R. J. Nelson (Ed.), *Biology of aggression* (pp. 275–291). New York: Oxford University Press.
- Blumberg, M. S. (2017). Development evolving: the origins and meanings of instinct. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, *8*(1-2), e1371. doi: 10.1002/wcs.1371
- Boeke, E. A., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., Phelps, E. A., & Hartley, C. A. (2017). Active avoidance: Neural mechanisms and attenuation of pavlovian conditioned responding. *The Journal of Neuroscience*, *37*(18), 4808–4818. doi: 10.1523/jneurosci.3261-16.2017
- 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*(1-2), 17–31. doi: 10.1016/0168-1591(95)00633-8
- Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Animal Learning & Behavior*, *8*(3), 429–434. doi: 10.3758/bf03199629
- Boyce, W. T., & Ellis, B. J. (2005). Biological sensitivity to context: I. An evolutionary–developmental theory of the origins and functions of stress reactivity. *Development and Psychopathology*, *17*(2), 271-301. doi: 10.1017/s0954579405050145
- Broom, D. M., & Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Brown, T. M., & Fee, E. (2002). Walter Bradford Cannon. *American Journal Of Public Health*, *92*(10), 1594-1595. doi: 10.2105/ajph.92.10.1594
- Buffington, C. A., Westropp, J. L., Chew, D. J., & Bolus, R. R. (2006). Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, *8*(4), 261–268. doi: 10.1016/j.jfms.2006.02.002

- Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2007). Escape from fear: A detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *33*(4), 451–463. doi: 10.1037/0097-7403.33.4.451
- Cameron, M. E., Casey, R. A., Bradshaw, J. W., Waran, N. K., & Gunn-Moore, D. A. (2004). A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. *Journal of Small Animal Practice*, *45*(3), 144–147. doi: 10.1111/j.1748-5827.2004.tb00216.x
- Cameron, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., & Meaney, M. J. (2005). The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(4-5), 843–865. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.022
- Carlstead, K., Mellen, J., & Kleiman, D. G. (1999). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: I. individual behavior profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology*, *18*(1), 17–34. doi: 10.1002/(sici)1098-2361(1999)18:1<17::aid-zoo4>3.3.co;2-b
- Caspi, A., Begg, D., Dickson, N., Harrington, H., Langley, J., Moffitt, T. E., & Silva, P. A. (1997). Personality differences predict health-risk behaviors in young adulthood: Evidence from a longitudinal study. *Journal of Personality and Social Psychology*, *73*(5), 1052–1063. doi: 10.1037//0022-3514.73.5.1052
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, *67*(1), 259–284. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816
- Chrousos, G. P. (2000). The stress response and immune function: Clinical implications: The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *917*(1), 38–67. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05371.x
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, *5*(7), 374–381. doi: 10.1038/nrendo.2009.106
- Cockrem, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology*, *181*, 45–58. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.11.025

Introducción general

- Cook, N. J. (2012). Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science*, 92(3), 227–259. doi: 10.4141/cjas2012-045
- Dantzer, R. (2016). Behavior: Overview. In: G. Fink (Ed.), *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior* (pp. 57–63). London: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Davis, M. (2006). Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *American Psychologist*, 61(8), 741–756. doi: 10.1037/0003-066x.61.8.741
- Davis, M., & Whalen, P. J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 13–34. doi: 10.1038/sj.mp.4000812
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475. doi: 10.1038/nrn1683
- Del Cerro, M. C., Pérez-Laso, C., Ortega, E., Martín, J. L., Gómez, F., Pérez-Izquierdo, M. A., & Segovia, S. (2010). Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 593–602. doi: 10.1016/j.bbr.2010.01.003
- Del Giudice, M. (2012). Fetal programming by maternal stress: Insights from a conflict perspective. *Psychoneuroendocrinology*, 37(10), 1614–1629. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.014
- Defauw, P. A., Van de Maele, I., Duchateau, L., Polis, I. E., Saunders, J. H., & Daminet, S. (2011). Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13(12), 967–975. doi: 10.1016/j.jfms.2011.08.001
- Dimski, D. S., & Taboada, J. (1995). Feline idiopathic hepatic lipidosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 25(2), 357–373. doi: 10.1016/s0195-5616(95)50031-2
- Dingemanse, N. J., & Réale, D. (2005). Natural selection and animal personality. *Behaviour*, 142(9-10), 1159–1184. doi: 10.1163/156853905774539445
- Diorio, D., Viau, V., & Meaney, M. J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *The Journal of Neuroscience*, 13(9), 3839–3847. doi: 10.1523/jneurosci.13-09-03839.1993

- Ebner, K., & Singewald, N. (2017). Individual differences in stress susceptibility and stress inhibitory mechanisms. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *14*, 54–64. doi: 10.1016/j.cobeha.2016.11.016
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (1999). Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *10*(9), 359–368. doi: 10.1016/s1043-2760(99)00188-5
- Ellis, B. J., Jackson, J. J., & Boyce, W. T. (2006). The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. *Developmental Review*, *26*(2), 175–212. doi: 10.1016/j.dr.2006.02.004
- Enck, P., & Holtmann, G. (1992). Stress and gastrointestinal motility in animals: a review of the literature. *Neurogastroenterology & Motility*, *4*(2), 83–90. doi: 10.1111/j.1365-2982.1992.tb00084.x
- Fanselow, M. S. (1980). Signaled shock-free periods and preference for signaled shock. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *6*(1), 65–80. doi: 10.1037//0097-7403.6.1.65
- Fletcher, G. J. O. (1995). Two uses of folk psychology: Implications for psychological science. *Philosophical Psychology*, *8*(3), 221–238. doi: 10.1080/09515089508573155
- Foa, E. B., Zinbarg, R., & Rothbaum, B. O. (1992). Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: An animal model. *Psychological Bulletin*, *112*(2), 218–238. doi: 10.1037/0033-2909.112.2.218
- 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*(3), 340–374. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.016
- Forrester, S. D., & Towell, T. L. (2015). Feline idiopathic cystitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *45*(4), 783–806. doi: 10.1016/j.cvsm.2015.02.007
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., & Meaney, M. J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, *286*(5442), 1155–1158. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5442.1155>

Introducción general

- Frith, C., Perry, R., & Lumer, E. (1999). The neural correlates of conscious experience: an experimental framework. *Trends in Cognitive Sciences*, 3(3), 105–114. doi: 10.1016/s1364-6613(99)01281-4
- Gartner, M.C., & Powell, D.N. (2012). Personality assessment in snow leopards (*Uncia uncia*). *Zoo biology*, 31(2), 151-165. doi: 10.1002/zoo.20385
- Gluck, M. A., Mercado, E., & Myers, C. E. (2007). *Learning and memory: from brain to behavior*. New York: Worth Publishers.
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), 109-120. doi: 10.1080/10253890701288935
- Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S., & Koren, G. (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Science International*, 196(1-3), 32–37. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.12.040
- Grupe, D. W., & Nitschke, J. B. (2013). Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 488–501. doi: 10.1038/nrn3524
- Habib, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(3), 695–728. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70208-5
- Hart, B. L., & Hart, L. A. (2014). Feline behavioural problems and solutions. In: D. C. Turner, P. Bateson (Ed.), *The domestic cat. The biology of its behaviour* (pp. 202–212). Cambridge: Cambridge University Press.
- Heyes, C. (2015). Animal mindreading: what's the problem? *Psychonomic Bulletin & Review*, 22(2), 313–327. doi: 10.3758/s13423-014-0704-4
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151–180. doi: 10.1016/j.yfrne.2003.07.001

- Herpfer, I., Hezel, H., Reichardt, W., Clark, K., Geiger, J., Gross, C. M., ... Normann, C. (2012). Early life stress differentially modulates distinct forms of brain plasticity in young and adult mice. *PLoS ONE*, *7*(10), e46004. doi: 10.1371/journal.pone.0046004
- Holland, P. C., & Gallagher, M. (1999). Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(2), 65–73. doi: 10.1016/s1364-6613(98)01271-6
- Hollon, N. G., Burgeno, L. M., & Phillips, P. E. M. (2015). Stress effects on the neural substrates of motivated behavior. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1405–1412. doi: 10.1038/nn.4114
- Inder, W. J., Dimeski, G., & Russell, A. (2012). Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clinical Endocrinology*, *77*(5), 645–651. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04508.x
- Izquierdo, A., Wellman, C. L., & Holmes, A. (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *Journal of Neuroscience*, *26*(21), 5733–5738. doi: 10.1523/jneurosci.0474-06.2006
- Joëls, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M. S., & Krugers, H. J. (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends in Cognitive Sciences*, *10*(4), 152–158. doi: 10.1016/j.tics.2006.02.002
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neuroscience*, *10*(6), 459–466. doi:10.1038/nrn2632
- Kim, J. J., Song, E. Y., & Kosten, T. A. (2006). Stress effects in the hippocampus: Synaptic plasticity and memory. *Stress*, *9*(1), 1–11. doi: 10.1080/10253890600678004
- Kim, M. J., Loucks, R. A., Palmer, A. L., Brown, A. C., Solomon, K. M., Marchante, A. N., & Whalen, P. J. (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: From normal emotion to pathological anxiety. *Behavioural Brain Research*, *223*(2), 403–410. doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.025
- Kolb, B., & Gibb, R. (2010). Tactile stimulation after frontal or parietal cortical injury in infant rats facilitates functional recovery and produces synaptic changes in adjacent cortex. *Behavioural Brain Research*, *214*(1), 115–120. doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.024

Introducción general

- Koolhaas, J. M. (2008). Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *22*(5), 662–667. doi: 10.1016/j.bbi.2007.11.006
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., ... Blokhuis, H. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *23*(7), 925–935. doi: 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*(4), 218–226. doi: 10.1159/000105485
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., De Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(5), 1291-1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Koren, L., Mokady, O., Karaskov, T., Klein, J., Koren, G., & Geffen, E. (2002). A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Animal Behaviour*, *63*(2), 403–406. doi: 10.1006/anbe.2001.1907
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., & McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(1), 3–38. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.08.009
- Kovács, K. J., Miklós, I. H., & Bali, B. (2005). Psychological and physiological stressors. In: T. Steckler, N. H. Kalin, J. M. H. M Reul (Ed.), *Handbook of Stress and the Brain* (pp. 775-792). Amsterdam: Elsevier.
- Kruk, M. R., Halász, J., Meelis, W., & Haller, J. (2004). Fast positive feedback between the adrenocortical stress response and a brain mechanism involved in aggressive behavior. *Behavioral Neuroscience*, *118*(5), 1062–1070. doi: 10.1037/0735-7044.118.5.1062
- Landsberg, G. M., Hunthausen, W. L., & Ackerman, L. J. (2003). Stereotypic and compulsive disorders. In: G. M. Landsberg, W. L. Hunthausen, L. J. Ackerman (Ed.), *Handbook of behavior problems of the dog and cat* (pp. 195–225). Philadelphia: Elsevier Saunders.

- Lazarus, R. S. (2000). Toward better research on stress and coping. *American Psychologist*, *55*(6), 665–673. doi: 10.1037//0003-066x.55.6.665
- Le Moal, M. (2007). Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology*, *32*, S3–S9. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.03.019
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, *23*(1), 155–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- LeDoux, J. E. (2014). Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(8), 2871–2878. doi: 10.1073/pnas.1400335111
- LeDoux, J. E. (2015). *Anxious: Using the brain to understand and treat fear and anxiety*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E., Moscarello, J., Sears, R., & Campese, V. (2017). The birth, death and resurrection of avoidance: a reconceptualization of a troubled paradigm. *Molecular Psychiatry*, *22*(1), 24–36. doi: 10.1038/mp.2016.166
- Levine, S. (1957). Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, *126*(3270), 405. doi: 10.1126/science.126.3270.405
- Levine, S. (2005). Stress: an historical perspective. In: T. Steckler, N.H. Kalin, J. M. H. M Reul (Ed.), *Handbook of Stress and the Brain* (pp. 3–23). Amsterdam: Elsevier.
- Li, H. Y., Ericsson, A., & Sawchenko, P. E. (1996). Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(6), 2359–2364. doi: 10.1073/pnas.93.6.2359
- Lightman, S. L., & Conway-Campbell, B. L. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(10), 710–718. doi: 10.1038/nrn2914
- Luescher, A. U. (2003). Diagnosis and management of compulsive disorders in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *33*(2), 253–267. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00100-6

Introducción general

- Maier, S. F., & Seligman, M. E. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105(1), 3–46. doi: 10.1037/0096-3445.105.1.3
- Manteca, X. (2003). *Etología clínica veterinaria del perro y el gato*. Barcelona: Multimédica ediciones veterinarias.
- Manteca, X., & Deag, J. M. (1993). Individual differences in temperament of domestic animals: a review of methodology. *Animal Welfare*, 2(3), 247-268.
- Manteca, X., Amat, M., Salas, M., Temple, D. (2016). Animal-based indicators to assess welfare in zoo animals. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 11(010). doi: 10.1079/pavsnnr201611010
- Mcdougall, P. T., Réale, D., Sol, D., & Reader, S. M. (2006). Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation*, 9(1), 39–48. doi: 10.1111/j.1469-1795.2005.00004.x
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886(1-2), 172-189. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4
- McEwen, B.S. (2007). Stress, Definitions and Concepts of. In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (pp. 653–653). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones And Behavior*, 43(1), 2-15. doi: 10.1016/s0018-506x(02)00024-7
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating memories. *Annual Review of Psychology*, 66(1), 1–24. doi: 10.1146/annurev-psych-010814-014954
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1161–1192. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1161
- Mendl, M. (1999). Performing under pressure: stress and cognitive function. *Applied Animal Behaviour Science*, 65(3), 221–244. doi: 10.1016/s0168-1591(99)00088-x

- Mills, D., Karagiannis, C., & Zulch, H. (2014). Stress—Its effects on health and behavior: A guide for practitioners. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *44*(3), 525–541. doi: 10.1016/j.cvsm.2014.01.005
- Mineka, S., & Kihlstrom, J. F. (1978). Unpredictable and uncontrollable events: A new perspective on experimental neurosis. *Journal of Abnormal Psychology*, *87*(2), 256–271. <https://doi.org/10.1037/0021-843X.87.2.256>
- Mineka, S., & Hendersen, R. W. (1985). Controllability and predictability in acquired motivation. *Annual Review of Psychology*, *36*(1), 495–529. doi: 10.1146/annurev.ps.36.020185.002431
- Miracle, A. D., Brace, M. F., Huyck, K. D., Singler, S. A., & Wellman, C. L. (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(3), 213–218. doi: 10.1016/j.nlm.2005.10.005
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: G.P. Moberg, J.A. Mench (Ed.), *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare* (pp. 1–21). Wallingford: CABI Publishing.
- Moberg, G. P., & Mench, J.A. (2000). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford: CABI Publishing.
- Morgan, M. A., Romanski, L. M., & LeDoux, J. E. (1993). Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, *163*(1), 109–113. doi: 10.1016/0304-3940(93)90241-c
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., ... Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, *92*(3), 317–339. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003
- Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C., & Palme, R. (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, *46*(10), 621–631. doi: 10.1046/j.1439-0442.1999.00256.x

Introducción general

- Möstl, E., Maggs, J. L., Schrötter, G., Besenfelder, U., & Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary Research Communications*, *26*(2), 127–139. doi: 10.1023/a:1014095618125
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, *23*(1-2), 67–74. doi: 10.1016/s0739-7240(02)00146-7
- Munck, A., Guyre, P. M., & Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, *5*(1), 25–44. doi: 10.1210/edrv-5-1-25
- Myers, B., Mcklveen, J. M., & Herman, J. P. (2012). Neural regulation of the stress response: The many faces of feedback. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *32*(5), 683–694. doi: 10.1007/s10571-012-9801-y
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, *36*(4), 567–584. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01064-4
- Otovic, P., & Hutchinson, E. (2015). Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. *Altex*, *32*(1), 41-50. doi:10.14573/altex.1406161
- Ottaviani, E., & Franceschi, C. (1998). A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness. *Domestic Animal Endocrinology*, *15*(5), 291–296. doi: 10.1016/s0739-7240(98)00021-6
- Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, *22*(4), 502-548. <https://doi.org/10.1210/er.22.4.502>
- Paul, E. S., Harding, E. J., & Mendl, M. (2005). Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(3), 469–491. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.01.002
- Quirk, G. J., & Beer, J. S. (2006). Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(6), 723–727. doi: 10.1016/j.conb.2006.07.004

- Radley, J. J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G., Liston, C., Hof, P. R., ... Morrison, J. H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, *16*(3), 313–320. doi: 10.1093/cercor/bhi104
- Réale, D., Reader, S. M., Sol, D., Mcdougall, P. T., & Dingemans, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, *82*(2), 291–318. doi: 10.1111/j.1469-185x.2007.00010.x
- Richards, S., Mychasiuk, R., Kolb, B., & Gibb, R. (2012). Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behavioural Brain Research*, *231*(1), 86–91. doi: 10.1016/j.bbr.2012.02.043
- Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., & Sapolsky, R. M. (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, *32*(1), 289–313. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135620
- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*(2), 89–95.
- Romero, L. M., Dickens, M. J., & Cyr, N. E. (2009). The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior*, *55*(3), 375–389. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.12.009
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 423–433. doi: 10.1038/nrn2651
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, *125*(6), 797–824. doi: 10.1037/a0026187
- Rushen, J. (2000). Some issues in the interpretation of behavioural responses to stress. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare.*, 23–42. doi: 10.1079/9780851993591.0023
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589–601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009

Introducción general

- Sapolsky, R. M. (2004). *Why zebras don't get ulcers*. New York: Owl Book/Henry Holt and Co.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, *21*(1), 55–89. doi: 10.1210/edrv.21.1.0389
- Schatz, S., & Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications*, *25*(4), 271–287. doi: 10.1023/a:1010626608498
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1740–1749. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.07.002
- Seckl, J. R., & Meaney, M. J. (2004). Glucocorticoid programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1032*(1), 63–84. doi: 10.1196/annals.1314.006
- Seligman, M. E., Maier, S. F., & Solomon, R. L. (1971). Unpredictable and uncontrollable aversive events. In: F. R. Brush (Ed.), *Aversive conditioning and learning* (pp. 347–400). New York: Academic Press.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, *138*(3479), 32–32. doi: 10.1038/138032a0
- Selye, H. (1956). *The stress of life*. New York: McGraw-Hill.
- Selye, H. (1974). *Stress without distress*. Philadelphia: Lippincott.
- Shors, T. J. (2006). Stressful experience and learning across the lifespan. *Annual Review of Psychology*, *57*(1), 55–85. doi: 10.1146/annurev.psych.57.102904.190205
- Sih, A., Bell, A. M., Johnson, J. C., & Ziemba, R. E. (2004). Behavioral syndromes: An integrative overview. *The Quarterly Review of Biology*, *79*(3), 241–277. doi: 10.1086/422893
- Sotres-Bayon, F., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2006). Brain mechanisms of fear extinction: Historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*, *60*(4), 329–336. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.10.012

- Steptoe, A. (2007). Stress effects, overview. In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (pp. 599–600). Amsterdam: Academic Press.
- Talló, O. (2016). *Hair cortisol in cattle as a measure of long-term adrenal activity* (PhD Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Tanaka, A., Wagner, D. C., Kass, P. H., & Hurley, K. F. (2012). Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *240*(5), 570–576. doi: 10.2460/javma.240.5.570
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, *53*(4), 865–871. doi: 10.1016/s0022-3999(02)00429-4
- Virga, V. (2003). Behavioral dermatology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *33*(2), 231–251. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00102-x
- Weinberg, J., Levine, S. (1980). Psychobiology of coping in animals: the effects of predictability. In S. Levine, H. Ursin (Ed.), *Coping and Health* (pp. 39–59). Boston: Springer.
- Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(6), 1073–1086. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002
- Weiss, J. M. (1970). Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosomatic Medicine*, *32*(4), 397–408. doi: 10.1097/00006842-197007000-00008
- Westropp, J. L., & Buffington, C. A. (2004). Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *34*(4), 1043–1055. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.03.002
- Willemse, T., Vroom, M. W., Mol, J. A., & Rijnberk, A. (1993). Changes in plasma cortisol, corticotropin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone concentrations in cats before and after physical restraint and intradermal testing. *American journal of veterinary research*, *54*(1), 69-72.
- Woodson, J. C., Macintosh, D., Fleshner, M., & Diamond, D. M. (2003). Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learning & Memory*, *10*(5), 326–336. doi: 10.1101/lm.62903

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis es el de avanzar en el estudio de las respuestas comportamentales y fisiológicas en situaciones de estrés en el perro y el gato enfocándolo al contexto de los problemas de comportamiento.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Examinar las respuestas conductuales y fisiológicas de los perros inducidas por la exposición a una situación estresante basada en la aplicación de un estímulo sonoro intenso de manera repetida.
2. Evaluar el efecto de la predictibilidad sobre las respuestas defensivas comportamentales y fisiológicas consecuencia del estrés derivado de la aplicación de un estímulo aversivo.
3. Analizar la influencia de una serie de factores individuales y ambientales en la concentración de cortisol en el pelo.
4. Estudiar las diferencias en los niveles de cortisol en pelo entre individuos que muestran cambios de comportamiento relacionados con el estrés en comparación con aquellos que no los presentan.
5. Valorar el uso potencial de la determinación del cortisol en pelo para evaluar el éxito de las estrategias dirigidas a reducir el estrés dentro de los protocolos de tratamiento habituales.
6. Revisar la terminología empleada en la ciencia del comportamiento animal y en la etología clínica y plantear las consecuencias que se pueden generar como consecuencia de la extendida presencia del antropomorfismo en estas áreas.

CAPÍTULO 1

Efecto de la predictibilidad sobre la respuesta de estrés en perros de raza beagle

1. INTRODUCCIÓN

Los animales que viven en entornos domésticos han de enfrentarse a condiciones ambientales muy diferentes a las programadas biológicamente. Esto podría enfatizar las consecuencias aversivas que pueden derivarse del estrés (Chrousos, 2009), pues en la naturaleza normalmente las situaciones estresantes suelen ser de corta duración (Sapolsky, 2004) y la respuesta que se activa otorga los mecanismos necesarios para afrontar dichas situaciones. Sin embargo, en las ocasiones en las que el individuo no puede adaptarse con éxito a los estresores que ha de enfrentar, el estrés pasa a ser una circunstancia perjudicial (Moberg, 2000). Este hecho – dentro del contexto doméstico – facilita la aparición de numerosos comportamientos indeseables cuyo estudio es importante por varias cuestiones: por un lado, representan un factor de riesgo para el abandono y la eutanasia (Salman et al., 1998; Scarlett et al., 1999) y pueden alterar el bienestar de los animales al generar estrés crónico (Moberg and Mench, 2000) y, por otro lado, tienen un impacto notable sobre la salud pública (Sacks et al., 1996), así como consecuencias negativas con respecto al vínculo con los humanos (Houpt et al., 1996).

En relación con las circunstancias potencialmente estresantes que pueden afectar a los animales domésticos, cabe señalar que muchas de ellas están relacionadas con eventos impredecibles que además no pueden controlar (Wiepkema and Koolhaas, 1993). Un ejemplo que puede ilustrar esta cuestión es el de las experiencias que los perros y los gatos viven habitualmente en la clínica veterinaria (Edwards et al., 2019). En ese contexto el animal se encuentra en un entorno desconocido en el que las manipulaciones e interacciones con el personal del centro aparecen de forma relativamente imprevisible y en donde no pueden controlar ni predecir qué les va a ocurrir (Lloyd, 2017). En el ambiente del hogar esta imprevisibilidad y falta de control suelen ir asociadas con frecuencia a cambios en las rutinas y a la inconsistencia en el manejo de los propietarios (Luescher and Reisner, 2008; Arhant et al., 2010; Amat et al., 2016). Por otra parte, como es lógico, la instauración de una mayor previsibilidad forma parte de los tratamientos de numerosos problemas de conducta (Amat et al., 2018), en especial de aquellas terapias que implican la señalización o advertencia de un evento aversivo. No obstante, particularmente en el caso de los perros, es posible que el tratamiento clásico que se aplica en algunos problemas no esté en concordancia con la importancia de capacitar al individuo para predecir lo que va a ocurrir (Amat et al., 2014). El debate concretamente se centra en la denominada ansiedad por separación, que constituye un diagnóstico frecuente en perros remitidos a las consultas de comportamiento (Denenberg et al., 2005; Bamberger and Houpt, 2006). Este problema aparece en los momentos en los que el animal es separado

físicamente de sus propietarios y pueden presentarse signos como la destructividad, eliminaciones, vocalizaciones, hipersalivación y jadeos, entre otros (Overall, 2013). Curiosamente, una de las recomendaciones habituales consiste en establecer imprevisibilidad en las salidas de los propietarios para reducir las respuestas anticipatorias de los perros en los momentos previos a dichas salidas (Takeuchi et al., 2000; Sherman & Mills, 2008). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia no ha sido probada y, tal y como se señalaba, parece entrar en contradicción con respecto a los conocimientos actuales sobre la influencia de la predictibilidad en la respuesta de estrés (Amat et al., 2014).

Centrándonos en esta cuestión concreta, cabe destacar que aunque tanto los eventos aversivos predecibles como los impredecibles inducen estados negativos en los individuos (Fanselow, 1980), son numerosos los estudios que demuestran la preferencia de los animales por los estímulos aversivos predecibles (Mineka and Kihlstrom, 1978; Fanselow, 1980) e incluso la reducción de los efectos del estrés a través de la predictibilidad (Seligman et al., 1971; Foa et al., 1992). Además, las consecuencias de la no señalización de los estímulos aversivos también pueden verse a nivel de respuestas fisiológicas como una mayor ulceración, incrementos en la temperatura corporal o en la conducta de defecación, entre otras (Weiss, 1970; Mezinis et al., 1971). Asimismo, encontramos estudios que relacionan la predictibilidad con medidas fisiológicas de estrés (Dess et al., 1983; Galhardo et al., 2011; Smith et al., 2013; Madaro et al., 2016).

En otro orden de cosas, existen diferentes modelos para analizar las respuestas anticipatorias y la inhibición conductual de los animales en situaciones desafiantes. En este sentido, los llamados modelos animales de ansiedad se suelen agrupar en dos clases. Por un lado, aquellos que utilizan paradigmas etológicos e implican reacciones espontáneas y naturales del individuo frente a estímulos o situaciones estresantes que no entrañan explícitamente dolor o malestar. Y, por otro lado, los modelos que involucran respuestas condicionadas del animal a eventos estresantes a menudo dolorosos (Bourin et al., 2007). Dentro de los primeros se encuentra el test de *open field*, que constituye una prueba frecuentemente utilizada para observar la actividad motora general, el comportamiento exploratorio y las medidas de ansiedad de los sujetos de estudio (Kumar et al., 2013). Por otra parte, el condicionamiento de amenaza – que entraría dentro de los modelos de respuesta condicionada – es uno de los paradigmas más utilizados para estudiar el comportamiento defensivo. El condicionamiento de amenaza entra dentro del aprendizaje asociativo y constituye una variante del condicionamiento clásico o pavloviano (LeDoux, 2015). Concretamente, en este tipo de aprendizaje un estímulo en origen inocuo se combina con otro aversivo, estableciéndose una asociación. De esta forma, el estímulo originalmente neutro pasa a ser uno condicionado capaz de

provocar una respuesta refleja similar al estímulo aversivo incondicionado. En cuanto al tema que nos ocupa, este paradigma también se ha utilizado específicamente para examinar los efectos de la imprevisibilidad, comparando las respuestas de los individuos en función de si anticipan un estímulo aversivo predecible o uno impredecible (Grillon et al., 2006; Shankman et al., 2011).

Al mismo tiempo, la extensa literatura sobre el condicionamiento pavloviano muestra que el condicionamiento se produce tanto con el estímulo condicionado específico que predice el incondicionado, como con el contexto en que ocurren los eventos (Rudy and O'Reilly, 1999). Es decir, el contexto es en sí mismo un estímulo condicionado que está presente de forma continua. En relación con esto, conviene destacar que el contexto integra el conjunto de circunstancias alrededor de un evento, incluyendo no solo las características espaciales, sino también las temporales, los estímulos interoceptivos y los contextos sociales (Maren et al., 2013). Asimismo, cabe señalar que a nivel cerebral existe una considerable evidencia de que las estructuras subyacentes al condicionamiento a un estímulo condicionado específico y al contexto se superponen solo parcialmente (Marschner et al., 2008), siendo el hipocampo el principal encargado de la regulación contextual del condicionamiento de amenaza (Rudy, 2009; Maren, 2011). De hecho, la capacidad de discriminar los contextos seguros se ve afectada en el trastorno del pánico en personas debido a la alteración de la función hipocampal (Gorman et al., 2000). Referente a la predictibilidad, los eventos aversivos señalados (predecibles) provocan menos condicionamiento contextual que los no señalados (impredecibles) (Fanselow, 1980; Grillon et al., 2004). De nuevo, esto puede adquirir trascendencia clínica, pues Amat y colaboradores sugieren que podría incrementarse el condicionamiento al contexto – refiriéndose al espacio en el que los perros han de quedarse solos – cuando estos no pueden predecir la salida del propietario (Amat et al., 2014).

Por último, aunque existen estudios en diferentes especies en los que se analizan los efectos de la predictibilidad sobre la respuesta de estrés, incluidos roedores (Weiss, 1970; Smith et al., 2013), peces (Galhardo et al., 2011; Madaro et al., 2016) y seres humanos (Abbott and Badia, 1979; Lejuez et al., 2000; Shankman et al., 2011), apenas encontramos estudios en la especie canina (Dess et al., 1983). Si se tiene en consideración la frecuencia de los problemas de conducta citados anteriormente y sus consecuencias, parece importante profundizar en esta cuestión.

Los objetivos del capítulo consistieron, por un lado, en (1) examinar las respuestas conductuales y fisiológicas de los perros inducidas por la exposición a una situación estresante – basada en la aplicación de un estímulo sonoro aversivo - y, por otro lado, en (2) comprobar si, tal y como sucede

en estudios realizados en otras especies, establecer predictibilidad reduce el efecto estresante del estímulo aversivo. En ambos experimentos se utilizó el test de *open field* en combinación con la exposición a un sonido de alta intensidad para valorar la respuesta de estrés. Para establecer la diferencia entre los estímulos aversivos predecibles e impredecibles se utilizó un paradigma basado en el condicionamiento pavloviano de amenaza.

2. MATERIAL & MÉTODOS

Los trabajos experimentales se hicieron de acuerdo con la legislación sobre protección de los animales y bajo la supervisión del Comité de Ética.

2.1. Primer experimento: estudio piloto

2.1.1. Población de estudio

Un grupo de 16 perros considerados sanos de la colonia de perros del servicio de nutrición de las granjas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona se utilizó en este estudio. Todos ellos eran de raza beagle, ocho hembras y ocho machos. Dos de los animales fueron excluidos por presentar una importante inhibición conductual en el ambiente exterior y durante la fase de habituación que podía afectar al correcto desarrollo del experimento. Con lo cual, finalmente fueron catorce los perros que formaron parte del estudio, siete de ellos machos (7/14) y siete hembras (7/14), de edades comprendidas entre 5 y 8 años. Del total de machos, cuatro formaron parte del grupo control (4/7) y tres del grupo tratamiento (3/7). Con respecto al total de hembras, tres formaron parte del grupo control (3/7) y cuatro del grupo tratamiento (4/7).

Los perros se alojaban generalmente en grupos de dos en función de la compatibilidad, en habitáculos que medían aproximadamente 3 x 2 metros y situados todos ellos en el mismo edificio. Se les proporcionaba acceso libre al agua, la alimentación era racionada y durante las tareas de limpieza de las jaulas permanecían en grupo en un patio exterior.

2.1.2. Procedimiento

Se establecieron dos grupos experimentales y cada perro fue asignado de forma aleatoria en uno de los dos grupos: grupo control (sin predictibilidad) (n=7) y grupo tratamiento (con predictibilidad) (n=7). Se llevaron a cabo 36 sesiones con cada animal dentro del espacio del *open field*. En 32 de esas

sesiones eran expuestas a un estímulo sonoro aversivo, con y sin predictibilidad en función del grupo al que pertenecieran. Para el grupo control (sin predictibilidad) el estímulo aparecía de forma imprevista. En cambio, en el grupo tratamiento la presentación del sonido era señalada mediante el uso de un estímulo neutro (sonido de *clicker*). Este sonido en principio no produce una especial reacción en el individuo. Si inmediatamente después de su presentación se aplica un estímulo aversivo y esto se repite en diferentes ensayos, este estímulo originalmente neutro pasa a constituir un estímulo condicionado. En el caso del presente estudio el sonido del *clicker* se reproducía un segundo antes que el sonido aversivo.

Las 32 sesiones realizadas con cada perro tuvieron lugar a lo largo de cuatro semanas de estudio, con un total de 448 sesiones (en el conjunto de los catorce perros). Cada semana de estudio se realizaron 8 sesiones con cada individuo, repartidas en dos días (4 sesiones por día). Cada día se llevaban a cabo las sesiones con la mitad de los perros – pues por cuestiones logísticas no se podían hacer todos los animales en un mismo día –, de forma que al final de la semana todos ellos hubieran cumplido las 8 sesiones.

Los perros entraban en la sala de experimentación de forma individual. Mientras se desarrollaba cada una de las sesiones el observador esperaba en otra sala contigua y el resto de los animales lo hacía en su zona de confinamiento alejada del área de estudio. Al finalizar cada sesión se procedía a la limpieza de la sala con un producto enzimático para evitar la presencia de señales de otros perros que pudieran afectar al comportamiento del siguiente.

Por otra parte, el horario de las sesiones se distribuyó de forma aleatoria, de manera que los animales no entraran siempre a las mismas horas en la sala de experimentación.

2.1.3. *Open field* & exposición al estímulo sonoro aversivo

Se empleó una adaptación del modelo de Araujo y colaboradores, basado en el test de *open field* y la utilización de una grabación del sonido de fuegos artificiales reproducida durante la prueba para provocar respuestas defensivas en los perros (Araujo et al., 2013). En nuestro estudio los animales eran colocados en una habitación – dentro de las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la UAB – que medía aproximadamente 2x2 metros (Figura 1). El comportamiento de los perros era observado a través de una cámara web instalada en el techo de la habitación que además proveía el vídeo digital a un ordenador para su análisis posterior por un observador entrenado. Las medidas

Capítulo 1

conductuales podían incluir *freezing*, locomoción o distancia recorrida, *rearing*, olfateo, vocalización, *grooming* o acicalamiento, micción y defecación (Tabla 1).

Para la exposición al estímulo sonoro aversivo se utilizó una pista de fuegos artificiales que consistió en una recopilación de sonidos de discos compactos de desensibilización a ruidos. La pista se reproducía en un equipo de música en un momento determinado dentro de cada sesión (promedio de 92.5 dB) y tenía una duración de 10 segundos. El tiempo entre el sonido del *clicker* y el aversivo era de un segundo para el grupo tratamiento (con predictibilidad).

Tabla 1. Parámetros de comportamiento analizados durante las sesiones.

Comportamiento	Definición
<i>Freezing</i>	Ausencia de cualquier conducta dirigida. Se estimó que el animal permanecía congelado cuando se paraba y no presentaba ninguna actividad durante un segundo. Cada vez que esto ocurría se anotaban los segundos transcurridos con el animal en esa actitud y se sumaban los tiempos obtenidos al final de cada sesión.
Locomoción	Distancia recorrida medida en número de unidades de cuadrados del suelo en los que entraron con las patas delanteras.
<i>Rearing</i>	Postura erguida sobre las extremidades traseras apoyando las delanteras sobre las superficies verticales que limitaban el habitáculo del <i>open field</i> .
Olfateo	Inhalación de aire a través de las narinas estando el animal sentado, de pie o tumbado, en movimiento o estático y mostrando una evidente orientación hacia el entorno físico.
Vocalización	Acción de ladrar, gruñir, lloriquear, gemir o aullar en cualquier posición y ya fuera en movimiento o estático.
<i>Grooming</i>	Acción de limpieza de la superficie corporal por lamido o mordisqueando, dirigida hacia el cuerpo del animal (autolimpieza).
Micción	Orinar en posición sentado o de pie.
Defecación	Defecar en posición sentado o de pie.

Adaptada de Palestrini et al., 2010; Araujo et al., 2013; Scaglia et al., 2013; Cannas et al., 2014; Protopopova et al., 2014.



Figura 1. Fotografía del *open field* tomada desde la perspectiva de la cámara en el techo.

2.1.4. Fases experimentales

2.1.4.1. Fase de pruebas

A lo largo de una semana se hicieron varias pruebas con perros de raza beagle del servicio de docencia de las granjas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona para observar el comportamiento de los animales en el *open field* y poder desarrollar una plantilla base.

2.1.4.2. Fase de habituación

Se llevaron a cabo cuatro sesiones de habituación a la sala de experimentación. Todos los animales entraron de forma individual en la sala y cada sesión tuvo una duración de dos minutos. En el transcurso de ese tiempo no se realizó ninguna manipulación, ni los perros fueron expuestos al sonido aversivo. Hubo dos que no superaron esta primera fase de habituación y fueron descartados.

2.1.4.3. Fase de aplicación del estímulo aversivo

Esta fase estuvo constituida por las 448 sesiones experimentales de los catorce perros (32 por animal) en las que estos fueron expuestos al sonido aversivo de forma predecible o imprevisible en función del grupo al que pertenecieran. Las sesiones se repartieron a lo largo de cuatro semanas.

Todas las sesiones tuvieron una duración de 191 segundos para los perros del grupo tratamiento (con predictibilidad) y de 190 segundos en el caso de los del grupo control (sin predictibilidad). Las sesiones se dividieron en tres periodos (Figura 2): el previo al sonido aversivo (que podía durar de 60 a 120 segundos, es decir, en tiempos variables y establecidos de forma aleatoria), el periodo durante el que se reproducía el estímulo aversivo (con una duración de 10 segundos) y el último periodo tras el sonido (de nuevo, con una duración que podía ir de 60 a 120 segundos). El tiempo entre el sonido del *clicker* y el aversivo era de un segundo para el grupo tratamiento (con predictibilidad). Por este motivo había una diferencia de un segundo en la duración total por sesión entre los dos grupos.

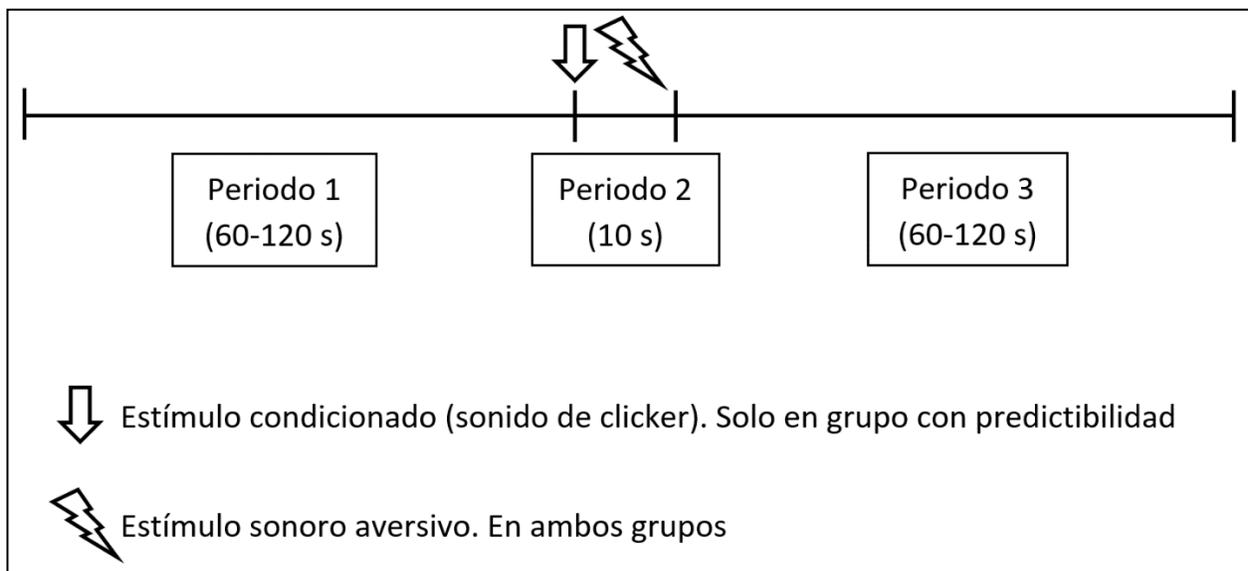


Figura 2. Esta imagen muestra un esquema de la división de los tiempos y periodos dentro de cada sesión. Periodo 1: fase anticipatoria en la que no se reproducía el sonido aversivo; periodo 2: fase en la que se reproducía la pista de fuegos artificiales a través de un sistema de altavoces; periodo 3: última fase en la que no se presentaba ningún estímulo.

2.1.5. Análisis de datos

Para el análisis de los datos se calcularon las medias de cada valor por minuto (número de eventos por minuto) y las medias del tiempo total que desarrollaban el comportamiento durante la sesión entre el número de veces que la hacían (tiempo por evento). Esto es, todas las medidas conductuales fueron analizadas en frecuencia por minuto y duración de la ocurrencia de los eventos. Comportamientos como la micción y defecación no se consideraron para el análisis estadístico debido a la escasa frecuencia con la que los animales los mostraron.

2.1.5.1. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un modelo Poisson mediante el procedimiento GENMOD de SAS (SAS.9.1. Institute, Inc., Cary, NC, EUA). El modelo completo incluyó un efecto de grupo, un efecto de periodo, la interacción periodo por grupo y el efecto aleatorio del animal.

Para comprobar si había diferencias significativas entre los dos grupos de perros dentro de cada periodo en cuanto a cada una de las conductas analizadas, tanto en duración como en frecuencia, se utilizó el test de chi-cuadrado (*The GENMOD Procedure*). De igual modo, para comprobar si había un efecto global del periodo significativo se utilizó el mismo test.

Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo para todos los análisis.

2.2. Segundo experimento

Se introdujeron varios cambios con respecto al estudio piloto. Por un lado, se incrementó el número de sesiones y se cambió la estructura de estas. En primer lugar, eliminando las fases dentro de las sesiones y extendiendo ligeramente el tiempo por sesión. Y, en segundo lugar, exponiendo a los perros en cinco ocasiones al estímulo sonoro aversivo en lugar de una única exposición. Por otro lado, se aumentó la intensidad del sonido aplicado y se modificaron las categorías de comportamiento analizadas. Por último, se combinó la valoración de los parámetros de comportamiento con medidas fisiológicas, concretamente el análisis de los niveles de cortisol en pelo.

2.2.1. Población de estudio

Un grupo de 12 perros considerados sanos de la colonia de perros del servicio de nutrición de las granjas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona se utilizó en este estudio. Todos eran de raza beagle, seis hembras (6/12) y seis machos (6/12). Del total de machos, tres formaron parte del grupo control (3/6) y tres del grupo tratamiento (3/6). Con respecto al total de hembras, tres formaron parte del grupo control (3/6) y otras tres del grupo tratamiento (3/6).

Los perros se alojaban generalmente en grupos de dos en función de la compatibilidad, en habitáculos que medían aproximadamente 3 x 2 metros y situados todos ellos en el mismo edificio. Se les proporcionaba acceso libre al agua, la alimentación era racionada y durante las tareas de limpieza de las jaulas permanecían en grupo en un patio exterior.

2.2.2. Procedimiento

Se establecieron dos grupos experimentales: grupo control (sin predictibilidad) (n=6) y grupo tratamiento (con predictibilidad) (n=6). Se llevaron a cabo 48 sesiones con cada perro dentro del espacio del *open field*. En 40 de esas sesiones fueron expuestos a estímulos sonoros aversivos, con y sin predictibilidad en función del grupo al que pertenecieran. Para el grupo control (sin predictibilidad) el estímulo aparecía de forma imprevista. En cambio, en el grupo tratamiento la presentación del sonido aversivo era señalada mediante el uso de un estímulo neutro (sonido de *clicker*). Este sonido en principio no produce una especial reacción en el animal. Si inmediatamente después de su presentación se aplica un estímulo aversivo y esto se repite en diferentes ensayos, este estímulo originalmente neutro pasa a constituir un estímulo condicionado. En el caso del presente estudio el sonido del *clicker* se reproducía un segundo antes que el sonido aversivo.

Las 40 sesiones de exposición al sonido aversivo realizadas con cada perro tuvieron lugar a lo largo de cinco semanas de estudio, con un total de 480 sesiones (en el conjunto de los doce perros). Cada semana de estudio se realizaron 8 sesiones con cada perro, repartidas en dos días (4 sesiones por día). Cada día se llevaban a cabo las sesiones con la mitad de los perros – pues por cuestiones logísticas no se podían hacer todos los animales en un mismo día –, de forma que al final de la semana todos los animales hubieran cumplido las 8 sesiones.

Los perros entraban en la sala de experimentación de forma individual. Mientras se desarrollaba cada una de las sesiones el observador esperaba en la misma sala utilizando un biombo como estructura de separación visual y el resto de los animales en su zona de confinamiento alejada del área de estudio. Al finalizar cada sesión se procedía a la limpieza de la sala con un producto enzimático para evitar señales de otros perros que pudieran afectar al comportamiento del siguiente.

Por otra parte, el horario de las sesiones se distribuyó de forma aleatoria, de manera que los animales no entraran siempre a las mismas horas en la sala de experimentación.

2.2.3. *Open field* & exposición al estímulo sonoro aversivo

Al igual que en el primer experimento, se empleó una adaptación del modelo de Araujo y colaboradores, basado en el test de *open field* y la utilización de una grabación del sonido de fuegos artificiales reproducida durante la prueba para provocar respuestas defensivas en los perros (Araujo et al., 2013). En nuestro estudio los animales eran colocados en una habitación - dentro de las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la UAB – que medía aproximadamente 2x2 metros. El método de observación utilizado fue el muestreo de barrido cada 10 segundos (30 puntos de

observación por sesión). El comportamiento de los perros era observado a través de una cámara web colocada en el techo de la habitación que además proveía el vídeo digital a un ordenador para su análisis posterior por un observador entrenado. Se introdujeron algunos cambios con respecto a la valoración de los parámetros de comportamiento en comparación con el primer experimento. Concretamente, en este caso se optó por establecer las siguientes categorías (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros de comportamiento analizados durante las sesiones en ausencia del sonido aversivo.

Categoría de comportamiento	Subcategorías/definición
Actividad	Movimiento con olfateo: actividad motora dirigida al entorno físico, incluyendo la inhalación de aire a través de las narinas.
	Movimiento sin olfateo: desplazamiento del sujeto, caminando o corriendo, sin explorar el entorno.
	Inactividad: ausencia de actividad motora.
Postura	De pie: postura en la que el perro se mantiene con las cuatro extremidades extendidas y apoyadas en el suelo.
	Tumbado: postura en la que el animal mantiene las extremidades bajo el cuerpo o colocadas frente al mismo.
	Sentado: postura en la que el perro mantiene las extremidades delanteras extendidas y las traseras flexionadas.
	Rearing: Postura erguida sobre las patas traseras apoyando las delanteras sobre las superficies verticales del habitáculo.
Signos defensivos	Esta categoría incluía cuatro elementos: freezing – definido como la ausencia de todo movimiento excepto el requerido para la respiración, sin importar la postura y asociado a rigidez general del cuerpo –, cola entre las patas – definido como la posición de la cola entre las extremidades traseras –, orejas hacia atrás – definido como la posición aplanada de las orejas hacia la parte posterior de la cabeza – y el reflejo de sobresalto , definido como una secuencia de respuestas musculares rápidas de la cabeza, cuello y extremidades provocados por una estimulación sensorial abrupta e intensa. Los temblores no se valoraron por no poder observarse de forma clara en las grabaciones.

Conductas de desplazamiento	Esta categoría incluía tres elementos: lip licking – definido como el movimiento con la boca en el que parte de la lengua se muestra y se mueve a lo largo del labio superior, bostezo – definido como la apertura amplia de la boca seguida de inhalación – y rascado , definido como el contacto repetido de una de las extremidades posteriores con el cuerpo o la cara.
Vocalización	Acción de ladrar, gruñir, lloriquear, gemir o aullar en cualquier posición y ya sea en movimiento o estático.
Conducta de eliminación	Defecación o micción en posición sentado o de pie.

Adaptada de Palestrini et al., 2010; Konok et al., 2011; Pastore et al., 2011; Araujo et al., 2013; Protopopova et al., 2014; Hagenaaars et al., 2014; Landsberg et al., 2015.

Para la exposición al estímulo sonoro aversivo se utilizó una pista de fuegos artificiales que consistió en una recopilación de sonidos de discos compactos de desensibilización a ruidos que se reproducía en un equipo de música (promedio de 95 dB). En este caso se optó por repetir la exposición al estímulo aversivo en cinco ocasiones a lo largo de cada sesión y se redujo la duración de la pista de sonido a tres segundos. Los tiempos en los que aparecían los sonidos eran aleatorios en combinaciones diferentes. Al final del estudio cada perro se vio expuesto a las mismas combinaciones de tiempos. Al igual que en el primer experimento, el lapso entre el sonido del *clicker* y el aversivo era de un segundo. Por otra parte, con el objetivo de simplificar el análisis se revisó por separado el comportamiento de los perros durante la exposición al sonido aversivo utilizando una categorización diferente a la expuesta anteriormente (Tabla 3):

Tabla 3. Parámetros de comportamiento analizados durante las sesiones en presencia del sonido aversivo.

Categoría de comportamiento	Subcategorías/definición
Sin cambio de actividad o de postura	El animal mantiene la misma actividad y postura durante la exposición al sonido aversivo con relación al momento inmediatamente anterior. El movimiento de la cabeza no se tuvo en cuenta para este análisis, pues era frecuente la orientación de esta al aparecer el estímulo y esto podía alterar la interpretación de los resultados.

Cambio de actividad o de postura	El animal cambia de actividad o de postura durante la exposición al sonido aversivo con relación al momento inmediatamente anterior. De nuevo, el movimiento de la cabeza no se tuvo en cuenta con el objetivo de no alterar la interpretación de los resultados.
Signos defensivos	Esta categoría incluía cuatro elementos: freezing – definido como la ausencia de todo movimiento excepto el requerido para la respiración, sin importar la postura y asociada a rigidez general del cuerpo –, cola entre las patas – definido como la posición de la cola entre las extremidades traseras –, orejas hacia atrás – definido como la posición aplanada de las orejas hacia la parte posterior de la cabeza – y el reflejo de sobresalto , definido como una secuencia de respuestas musculares rápidas de la cabeza, cuello y extremidades provocados por una estimulación sensorial abrupta e intensa. Los temblores no se valoraron por no poder observarse de forma clara en las grabaciones.
Conductas de desplazamiento	Esta categoría incluía tres elementos: lip licking – definido como el movimiento con la boca en el que parte de la lengua se muestra y se mueve a lo largo del labio superior, bostezo – definido como la apertura amplia de la boca seguida de inhalación – y rascado , definido como el contacto repetido de una de las extremidades posteriores con el cuerpo o la cara.
Vocalización	Acción de ladrar, gruñir, lloriquear, gemir o aullar en cualquier posición y ya sea en movimiento o estático.
Conducta de eliminación	Defecación o micción en posición sentado o de pie.

Adaptada de Palestrini et al., 2010; Konok et al., 2011; Pastore et al., 2011; Araujo et al., 2013; Protopopova et al., 2014; Hagenars et al., 2014; Landsberg et al., 2015; Travain et al., 2015.

2.2.4. Organización cronológica del estudio

2.2.4.1. Primera toma de muestras

Se recogió alrededor de 250 mg de pelo por muestra utilizando una peladora. Son numerosos los estudios en animales que han revelado diferencias en la concentración de cortisol en pelo en función de la región anatómica (Macbeth et al., 2010; Terwissen et al., 2013; Moya et al., 2013; Fourie et al., 2016; Casal et al., 2017). Por este motivo, se estandarizó la región corporal de muestreo para todos los individuos, empleándose concretamente la zona cervical. Por otra parte, teniendo en cuenta que está descrito que las concentraciones de cortisol en pelo pueden variar en función del color de este (Bennet and Hayssen, 2010), se procuró coger pelo claro de todos los perros. Después, cada muestra fue identificada y almacenada a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz hasta que se llevó a cabo el análisis de todas ellas al final del estudio.

2.2.4.2. Fase de habituación

Se realizaron cuatro sesiones de habituación a la sala de experimentación. Todos los animales entraron de forma individual en la sala y cada sesión tuvo una duración de cinco minutos. Durante este periodo no se llevó a cabo ninguna manipulación, ni los perros fueron expuestos al sonido.

2.2.4.3. Fase de aplicación del estímulo aversivo

Esta fase estuvo constituida por las 480 sesiones experimentales de los doce perros (40 por animal) en las que fueron expuestos al sonido aversivo de forma predecible o imprevisible en función del grupo al que pertenecieran. Las sesiones se repartieron a lo largo de cinco semanas. Cada sesión tenía una duración de cinco minutos, tiempo durante el cual los animales eran expuestos al sonido aversivo en cinco ocasiones en tiempos aleatorios.

2.2.4.4. Fase final sin exposición al estímulo aversivo

Se llevaron a cabo cuatro sesiones más sin la exposición al sonido aversivo. De nuevo, todos los animales entraron de forma individual en la sala y permanecieron dentro durante cinco minutos en cada sesión.

2.2.4.5. Segunda toma de muestras

Se recogió una segunda muestra de pelo considerando las mismas cuestiones detalladas anteriormente.

2.2.5. Análisis de las muestras

Todos los análisis de las muestras fueron realizados en el Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la UAB (08193, Bellaterra, España).

2.2.6. Extracción y cuantificación del cortisol

Las muestras fueron lavadas con isopropanol durante 2.5 minutos tres veces. A continuación, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 36 horas aproximadamente y después se trituró el pelo en fragmentos de < 2 mm de longitud utilizando una peladora. Seguidamente se colocaron cincuenta miligramos del pelo triturado en un tubo Eppendorf y se añadió metanol. Tras 18 horas de agitación moderada a 30°C para la extracción de esteroides las muestras se centrifugaron y el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf y colocado en un calentador a 38°C. Una vez que el metanol se evaporó completamente, los extractos secos fueron reconstituidos con tampón EIA (inmunoensayos enzimáticos) provisto de un inmunoensayo competitivo ELISA para el cortisol (Neogen® Corporation Europe, Ayr, UK) y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa de análisis estadístico SAS (SAS V9.4. Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Los recuentos de las variables de comportamiento se analizaron mediante el procedimiento GENMOD para medidas repetidas. Se utilizó una distribución de Poisson o Binomial Negativa sobre la base del valor de la desviación. Los modelos estudiaron la evolución de cada variable de comportamiento a lo largo del tiempo (12 días de observación) y tomaron en cuenta el efecto del grupo (grupo predecible frente a control), así como la interacción día de observación por grupo. Los datos del cortisol en pelo se analizaron utilizando el procedimiento MIXED para medidas repetidas. El modelo tuvo en cuenta los efectos del tiempo de extracción de la muestra, el grupo (predecible frente a control) y la interacción tiempo por grupo. La probabilidad máxima residual se usó como método de estimación y las medias de mínimos cuadrados de los efectos fijos (LSMEANS) se usaron cuando el análisis de la varianza indicó diferencias significativas ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. Primer experimento: estudio piloto

3.1.1. Resultados globales

Conviene tener en cuenta que en este tipo de pruebas de conducta puede complicarse la interpretación de los comportamientos que se expresan de forma reducida. En este sentido, los comportamientos relacionados con la actividad resultaron ser las medidas más robustas y confiables en el estudio de Araujo y colaboradores (Araujo et al., 2013), en cuyo modelo se basó el que utilizamos en los dos estudios de este capítulo. Por lo tanto, era importante revisar de primeras cuál fue la actividad global de nuestros animales. En el caso concreto de este primer estudio, el análisis de los vídeos mostró que los perros pasaron la mayor parte del tiempo exhibiendo *freezing* (56,17% del tiempo total de observación) frente a la locomoción (14,96%). En cuanto al número de perros que manifestaron cada una de las conductas analizadas observamos que los catorce animales (100%) mostraron *freezing*, exhibieron locomoción y olfatearon en algún momento, trece perros (92,9%) vocalizaron, doce (85,7%) mostraron *rearing*, doce (85,7%) exhibieron conducta de *grooming*, once animales (78,6%) orinaron y dos (14,3%) defecaron en alguna ocasión.

Por su parte, el análisis estadístico reveló la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos para todas las conductas analizadas a nivel global, es decir, sin considerar los periodos dentro de cada sesión. La siguiente tabla recoge los resultados expresados en el p-valor (Tabla 4):

Tabla 4. Efecto global del grupo no significativo para todas las conductas analizadas.

	Duración (tiempo/evento)	Frecuencia (evento/minuto)
<i>Freezing</i>	0.20	0.30
<i>Rearing</i>	0.66	0.14
Olfateo	0.96	0.36
Vocalización	0.94	0.88
<i>Grooming</i>	-	0.24

La duración de la conducta de *grooming* expresada en tiempo/evento no se consideró para el análisis estadístico debido al número insuficiente de ocasiones en las que los perros mostraron esta conducta.

Por otra parte, el efecto global del grupo tampoco fue significativo en la conducta de locomoción expresado en el número de cuadrados cruzados por minuto ($P = 0.14$).

3.1.2. Comparación entre periodos

3.1.2.1. Análisis en duración de la ocurrencia de los eventos (expresado en tiempo/evento)

El análisis estadístico reveló que no existía un efecto global del periodo significativo en la duración de la ocurrencia del evento en cuanto al *rearing* ($P = 0.12$), el olfateo ($P = 0.27$) y las vocalizaciones ($P = 0.15$). Es decir, el tiempo que los perros manifestaban estos comportamientos cada vez que lo hacían no difería entre los periodos.

Sin embargo, sí se detectó un efecto global del periodo significativo en el caso del *freezing* ($P = 0.03$). Es decir, existían diferencias significativas en el tiempo que los perros manifestaban esta conducta en función del periodo. Concretamente, mostraron más tiempo de *freezing* por evento durante el periodo 3 (posterior al sonido aversivo) que durante el periodo 1 (previo al sonido) ($P < 0.0001$). En cuanto a las vocalizaciones, se observaron diferencias significativas en el tiempo que los perros manifestaban esta conducta cada vez que lo hacían entre el periodo 1 y el periodo 3 ($P = 0.0005$). Específicamente, los perros vocalizaron más tiempo durante el periodo previo a la exposición del estímulo sonoro que durante el periodo posterior. Con respecto al *rearing*, se hallaron diferencias significativas entre el periodo 1 y el periodo 3 ($P = 0.04$), de forma que los animales exploraron verticalmente más tiempo durante el periodo posterior a la aplicación del sonido que durante el periodo previo.

Por otra parte, dentro de cada periodo no hubo diferencias significativas entre grupos para todas las conductas analizadas a excepción del olfateo (Tabla 5). En este sentido, se detectaron diferencias significativas en cuanto al olfateo en el periodo 2 (durante la exposición al sonido aversivo), observándose que los perros del grupo con predictibilidad cuando olfateaban lo hacían menos tiempo que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.03$) (Figura 3).

Tabla 5. Resultados expresados en el p-valor de las diferencias entre grupos en relación con las conductas analizadas en cuanto a la duración de la ocurrencia de los eventos.

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
<i>Freezing</i>	0.40	0.14	0.16
<i>Rearing</i>	0.46	0.87	0.43
Olfateo	0.49	0.03	0.60
Vocalización	0.70	0.44	0.90

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos dentro de cada periodo para el *freezing*, el *rearing* y las vocalizaciones. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas en el caso del olfateo en el periodo 2. En concreto, durante este periodo los perros del grupo con predictibilidad cuando olfateaban lo hacían menos tiempo que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.03$). La duración de la conducta de *grooming* expresada en tiempo/evento no se consideró para el análisis estadístico debido al número insuficiente de ocasiones en las que los perros la mostraron. Periodo 1: antes del sonido aversivo; periodo 2: durante el sonido; periodo 3: después del sonido aversivo.

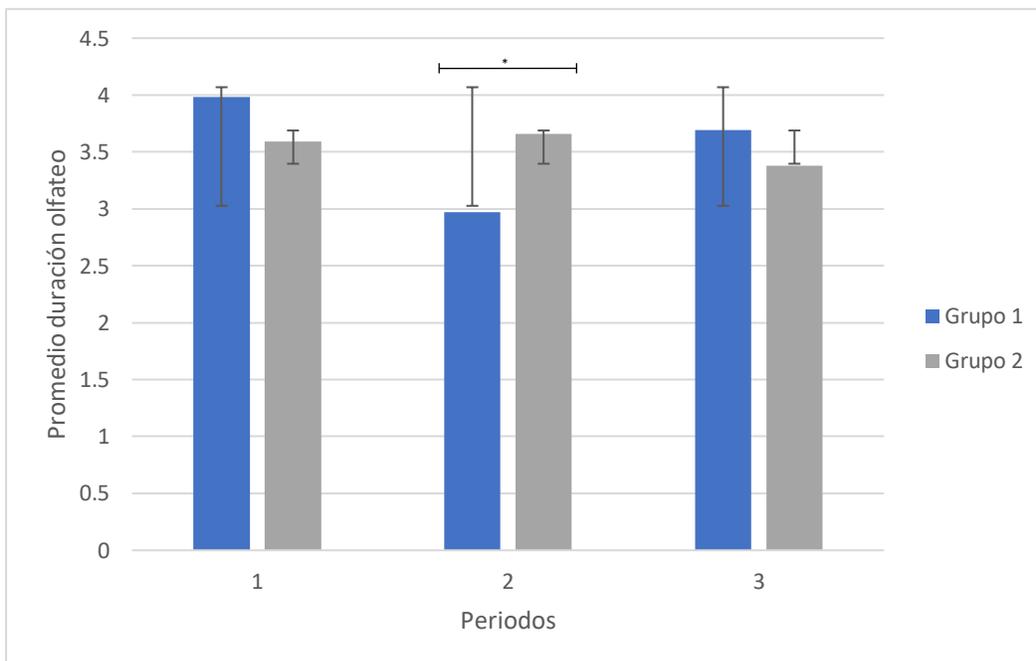


Figura 3. Comparación entre ambos grupos de los promedios de la duración de la conducta de olfateo por evento dentro de cada periodo. Se observaron diferencias significativas en el periodo 2 ($P = 0.03$). Periodo 1: antes del sonido aversivo; periodo 2: durante el sonido; periodo 3: después del sonido aversivo. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

3.1.2.2. Análisis en frecuencia por minuto (expresado en número de eventos/minuto)

El análisis estadístico reveló que no existía un efecto global del periodo significativo en la frecuencia de los eventos en cuanto al *grooming* ($P = 0.33$) y las vocalizaciones ($P = 0.08$). Es decir, el número de veces que los perros manifestaban estos comportamientos por minuto no difería entre los periodos.

Sin embargo, sí se detectó un efecto global del periodo significativo en el caso del *rearing* ($P = 0.02$). Es decir, el número de ocasiones que los perros manifestaban esta conducta por minuto difirió significativamente en función del periodo. Concretamente, los perros mostraron más veces la conducta de *rearing* durante el periodo 1 (previo al sonido aversivo) que durante el periodo 3 (posterior al sonido) ($P < 0.0001$). Con respecto al *freezing*, se encontró un efecto global del periodo significativo ($P = 0.002$), pero no se detectaron diferencias entre el periodo 1 y el periodo 3 ($P = 0.55$). En cuanto al olfateo, también se halló un efecto global del periodo significativo en la frecuencia del evento ($P = 0.003$). Específicamente, los perros mostraron más veces la conducta de olfateo durante el periodo 1 que durante el periodo 3 ($P < 0.0001$). Con relación a las vocalizaciones, se observaron diferencias significativas en el número de veces que los perros manifestaron la conducta entre el periodo 1 y el periodo 3. De forma concreta, los perros mostraron más veces la conducta de vocalización durante el periodo 1 que durante el periodo 3 ($P = 0.002$).

Por otro lado, dentro de cada periodo no se observaron diferencias significativas entre los grupos para el *freezing*, el olfateo y las vocalizaciones (Tabla 6). Sí se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en el periodo 1 (previo al sonido) para el *grooming* y en el periodo 2 (durante el sonido) para el *rearing*. De manera específica, en el periodo 1 los perros del grupo con predictibilidad realizaron significativamente más *grooming* que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.02$) (Figura 4) y durante el periodo 2 los perros del grupo con predictibilidad exploraron verticalmente más veces por minuto que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.006$) (Figura 5).

Por último, en cuanto a la locomoción el análisis estadístico reveló que existía un efecto global del periodo significativo en el número de cuadrados cruzados por minuto ($P = 0.004$). Específicamente, los perros cruzaron más cuadrados del suelo durante el periodo 1 (previo al sonido aversivo), que durante el periodo 3 (posterior al sonido) ($P < 0.0001$). No obstante, no se observaron diferencias significativas dentro de cada periodo entre los grupos: periodo 1 ($P = 0.14$), periodo 2 ($P = 0.06$), periodo 3 ($P = 0.24$).

Tabla 6. Resultados de las diferencias entre grupos en relación con las conductas analizadas en cuanto a la frecuencia de los eventos (número de eventos/minuto) expresados en el p-valor.

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
<i>Freezing</i>	0.13	0.16	0.68
<i>Rearing</i>	0.10	0.006	0.13
Olfateo	0.51	0.41	0.23
Vocalización	0.89	0.92	0.67
<i>Grooming</i>	0.02	0.33	0.06

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos dentro de cada periodo para el *freezing*, el olfateo y las vocalizaciones. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos en el periodo 1 (previo al sonido) para el *grooming* y en el periodo 2 (durante el sonido) para el *rearing*. En concreto, los perros del grupo con predictibilidad realizaron más *grooming* que los del grupo sin predictibilidad durante el periodo 1 ($P = 0.02$) y exploraron verticalmente más veces por minuto durante el periodo 2 ($P = 0.006$). Periodo 1: antes del sonido aversivo; periodo 2: durante el sonido; periodo 3: después del sonido aversivo.

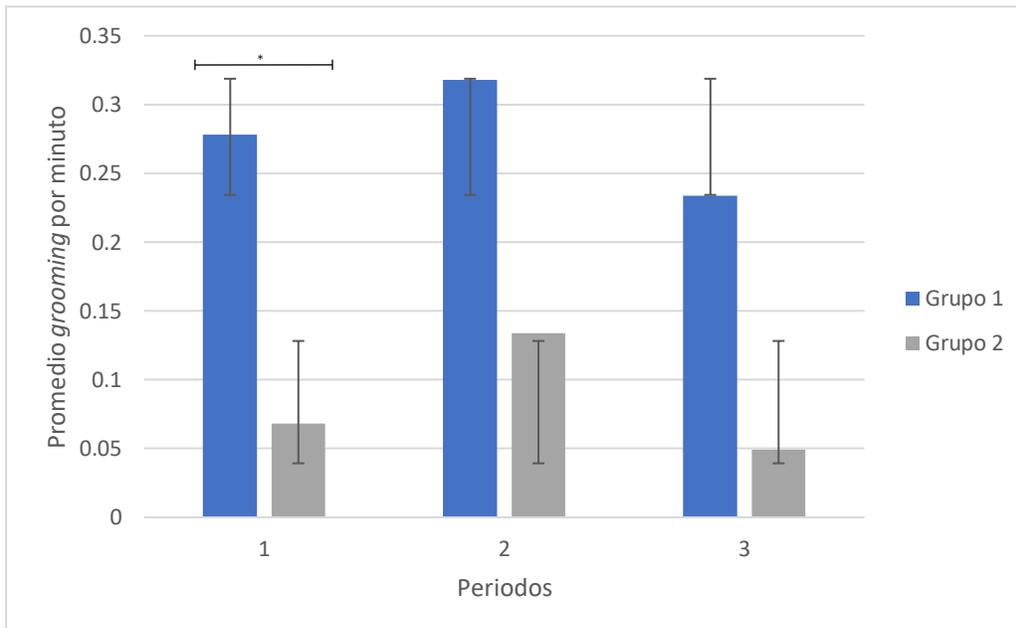


Figura 4. Comparación entre ambos grupos de los promedios de las frecuencias de la conducta de *grooming* por minuto. Se observaron diferencias significativas en el periodo 1 ($P = 0.02$). Periodo 1: antes del sonido aversivo; periodo 2: durante el sonido; periodo 3: después del sonido aversivo. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

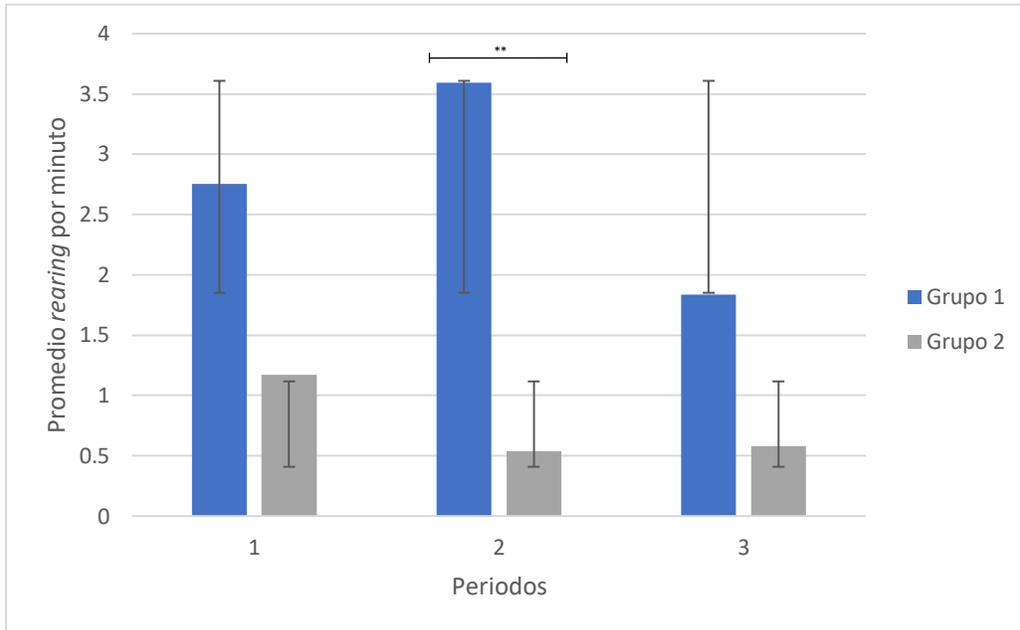


Figura 5. Comparación entre ambos grupos de los promedios de las frecuencias de la conducta de *rearing* por minuto. Se observaron diferencias significativas en el periodo 2 ($P = 0.006$). Periodo 1: antes del sonido aversivo; periodo 2: durante el sonido aversivo; periodo 3: después del sonido aversivo. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

A continuación se pasan a resumir los hallazgos más relevantes. Por una parte, se encontraron algunas diferencias significativas en función del periodo. Específicamente, los perros mostraron más tiempo de *freezing* por evento durante el periodo posterior a la aplicación del sonido aversivo (periodo 3) que durante el periodo previo a este (periodo 1) ($P < 0.0001$). De forma contraria, los animales recorrieron más distancia durante el periodo 1 que durante el periodo 3 ($P < 0.0001$). Además, los animales mostraron la conducta de vocalización más veces ($P = 0.002$) y durante más tiempo ($P = 0.0005$) y exhibieron más veces la conducta de olfateo ($P < 0.0001$) durante el periodo 1 que durante el periodo 3. Por otra parte, se halló un efecto del grupo en el periodo 1. En concreto, en este periodo los perros del grupo con predictibilidad realizaron significativamente más *grooming* que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.02$). También se encontró un efecto del grupo en el periodo 2 para el *rearing* y el olfateo. De tal manera que durante el lapso en el que se reproducía el estímulo sonoro los animales del grupo con predictibilidad exhibieron la conducta de *rearing* con más frecuencia que los del grupo sin predictibilidad ($P = 0.006$) y, al contrario, los del grupo sin predictibilidad mostraron conducta de olfateo por más tiempo que los del grupo con predictibilidad ($P = 0.03$).

3.2. Segundo experimento

3.2.1. Variables de comportamiento

3.2.1.1. Análisis general en ausencia y en presencia del sonido aversivo

Por un lado, no se halló ninguna diferencia significativa entre los grupos para ninguna de las variables comportamentales analizadas en ausencia del sonido aversivo. Tampoco se encontró ninguna influencia significativa del efecto general del día, ni de la interacción entre grupo y día (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados expresados en el p-valor del efecto general del grupo, del día y de la interacción entre grupo y día para cada una de las variables de comportamiento analizadas en ausencia del sonido aversivo.

	Mov olf	Mov sin	Inactiv	De pie	Sentado	Rearing	C desplaz	Vocaliz
Grupo	0.46	0.18	0.27	0.25	0.13	0.62	0.10	0.90
Día	0.38	0.36	0.36	0.36	0.36	.	0.37	0.44
Grupo*día	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.41	0.44

Los signos defensivos y la conducta de eliminación no se consideraron para el análisis estadístico debido al número insuficiente de ocasiones en las que los perros mostraron esta conducta. Mov olf: movimiento con olfateo; Mov sin: movimiento sin olfateo; Inactiv: inactividad; C desplaz: conductas de desplazamiento; Vocaliz: vocalización.

Por otro lado, el análisis comportamental de los perros durante la exposición al sonido aversivo tampoco arrojó diferencias significativas por el efecto del grupo, del día o de la interacción entre grupo y día (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados expresados en el p-valor del efecto general del grupo, del día y de la interacción entre grupo y día para cada una de las variables de comportamiento analizadas durante la exposición al sonido.

	Sin cambio actividad/postura	Cambio actividad/postura	Signos def	C desplaz
Grupo	0.31	0.28	0.09	0.94
Día	0.26	0.26	0.24	0.47
Grupo*día	0.30	0.32	0.27	0.32

Las vocalizaciones y la conducta de eliminación no se consideraron para el análisis estadístico debido al número insuficiente de ocasiones en las que los perros mostraron esta conducta. Signos def: signos defensivos; C desplaz: conductas de desplazamiento.

3.2.1.2. Análisis detallado en ausencia del sonido aversivo

Yendo un poco más al detalle y revisando la evolución del comportamiento de los animales a lo largo del estudio, surgieron algunos resultados que merece la pena comentar (Tabla 9). Para facilitar el análisis de la evolución en el tiempo se agruparon las sesiones por día, quedando un total de doce: un primer día de habituación (4 sesiones), diez días de aplicación del sonido aversivo con/sin tratamiento (4 sesiones por día, 40 en total) y un último día sin aplicación de sonido (4 sesiones). La expectativa al utilizar este modelo era la ausencia de diferencias significativas entre grupos en el día 0 (de habituación), así como encontrar dichas diferencias al final del periodo en el que se aplicó el sonido aversivo con/sin tratamiento (día 10). Incluso, podría haber un menor condicionamiento contextual si hubiera un efecto evidente de la presentación predecible del estímulo aversivo. Por tanto, se esperarían también diferencias entre ambos grupos el último día de experimental (día 11), en el que fueron expuestos a cuatro sesiones en el *open field* sin aplicación del sonido. Esto es, al inicio – durante el condicionamiento de amenaza – la presentación del sonido aversivo es imprevisible para ambos grupos y lo esperable es que se condicionen todas las señales contextuales circundantes. Sin embargo, con el tiempo el sonido del *clicker* acaba representando la señal saliente que anticipa la aparición del estímulo aversivo. No obstante, esto no ocurre cuando el sonido aversivo se aplica de forma imprevisible. Por tal motivo, como decíamos, si hay un efecto de la predictibilidad en nuestro modelo se esperarían diferencias entre ambos grupos en ese último día de exposición al contexto sin aplicación del estímulo aversivo.

Tabla 9. Resultados expresados en el p-valor de la comparación entre los dos grupos en días concretos del estudio en cuanto al análisis de las conductas en ausencia del sonido aversivo.

	Mov olf	Mov sin	Inactiv	De pie	Sentado	<i>Rearing</i>	C desplaz	Vocaliz
Día 0	0.59	0.84	0.53	0.04	0.02	0.42	0.02	0.47
Día 1	0.43	0.06	0.31	0.96	0.73	0.50	0.01	0.50
Día 5	0.52	0.26	0.35	0.05	0.22	0.55	0.46	0.96
Día 10	0.56	0.95	0.70	0.49	0.26	0.72	0.13	0.83
Día 11	0.93	0.52	0.52	0.16	0.15	0.61	0.01	0.89

De pie: los animales del grupo control (sin predictibilidad) pasaron más tiempo de pie que los del grupo tratamiento (con predictibilidad) el día de la habituación ($P = 0.04$). Sentado: los perros del grupo tratamiento (con predictibilidad) pasaron más tiempo sentados que los del grupo control (sin predictibilidad) el día de la habituación ($P = 0.02$). Conductas de desplazamiento: los animales del grupo tratamiento (con predictibilidad) mostraron más conductas de desplazamiento el día de la habituación ($P = 0.02$), el primer día de aplicación del

Capítulo 1

sonido ($P = 0.01$) y el último día ($P = 0.01$). Estas diferencias entre grupos al comienzo del experimental (día 0, habituación) sugieren un efecto animal inicial. Día 0: habituación; día 1: primer día de la fase de exposición al sonido; día 5: mitad de la fase de exposición al sonido; día 10: último día de la fase de exposición al sonido; día 11: último día de experimental sin exposición al sonido. Mov olf: movimiento con olfateo; Mov sin: movimiento sin olfateo; Inactiv: inactividad; C despla: conductas de desplazamiento; Vocaliz: vocalización.

A la luz de estos resultados, se cumplen las expectativas con respecto a los dos primeros días (día 0 y día 1) en relación con los comportamientos de la categoría de actividad. Es decir, no se esperaban diferencias entre los grupos al inicio. Las variables de postura “de pie” y “sentado” y la de las conductas de desplazamiento mostraron diferencias entre grupos desde el comienzo del estudio, lo cual sugiere un efecto animal inicial. Sin embargo, no se cumplieron las expectativas en cuanto al final del estudio y el último día de experimento ya sin exposición al sonido aversivo, puesto que no se detectaron diferencias entre los grupos.

A continuación se revisaron las diferencias entre días para cada uno de los comportamientos. En algunas de las variables se observaron cambios significativos en global (sin tener en cuenta los grupos) al comparar días del inicio del estudio, la mitad y el final de este (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados expresados en el p-valor de la comparación global (sin considerar los grupos) entre días concretos en cuanto al análisis de las conductas en ausencia del sonido aversivo.

	Mov olf	Mov sin	Inactiv	De pie	Sentado	<i>Rearing</i>	C desplaz	Vocaliz
Días 0 y 1	0.13	0.003	0.0004	0.73	0.04	0.008	0.81	0.02
Días 1 y 5	0.0007	0.009	0.0002	0.005	0.02	0.05	0.93	0.3
Días 1 y 10	0.28	0.39	0.1	0.42	0.87	0.21	< 0.0001	0.01
Días 5 y 10	< 0.0001	0.0003	< 0.0001	0.0002	0.004	0.004	0.01	0.13
Día 0 y 11	0.83	0.03	0.01	0.58	0.31	0.005	0.77	0.66

El movimiento con olfateo se reducía en la comparación entre los días 1 y el 5 y se incrementaba entre los días 5 y el 10. El movimiento sin olfateo se reducía en la comparación entre los días 0 y el 1, así como entre los días 0 y 11. De igual modo, se reducía entre los días 1 y 5, pero se incrementaba de nuevo entre los días 5 y el 10. En el caso de la inactividad, aumentaba entre los días 0 y 1, así como en la comparación entre los días 0 y 11. También aumentaba entre los días 1 y 5, pero disminuía entre los días 5 y 10. La posición de estar de pie se reducía entre los días 1 y 5 y se incrementaba entre los días 5 y 10. La posición de estar sentado aumentaba en la comparación entre los días 0 y 1. Además, aumentaba entre los días 1 y 5, pero disminuía entre los días 5 y

10. La posición de *rearing* se reducía entre los días 0 y 1, así como en la comparación entre los días 0 y 11. También se reducía entre los días 1 y 5, pero se incrementaba entre los días 5 y 10. Con respecto a las conductas de desplazamiento, estas aumentaban en la comparación entre los días 1 y 10 y entre los días 5 y 10. Por último, en cuanto a las vocalizaciones, estas se reducían entre los días 0 y 1 y se incrementaban en la comparación entre los días 1 y 10, así como los días 10 y 11. Día 0: habituación; día 1: primer día de la fase de exposición al sonido; día 5: mitad de la fase de exposición al sonido; día 10: último día de la fase de exposición al sonido; día 11: último día de experimental sin exposición al sonido. Mov olf: movimiento con olfateo; Mov sin: movimiento sin olfateo; Inactiv: inactividad; C despla: conductas de desplazamiento; Vocaliz: vocalización.

En resumen, al analizar las diferencias entre días en global se observó que una serie de conductas modificaban su frecuencia entre el día 0 (de habituación) y el día 1 (primer día de fase de exposición al sonido), como era de esperar. Concretamente, el movimiento sin olfateo se reducía ($P = 0.003$) y la inactividad se incrementaba ($P = 0.0004$). Por otra parte, la postura de estar sentado se incrementaba ($P = 0.04$) y la de *rearing* se reducía ($P = 0.008$). En cuanto a la comparación entre el inicio de la fase de exposición del sonido aversivo y el final de esta, no hubo diferencias significativas para la mayoría de las conductas, excepto para las vocalizaciones ($P = 0.01$) y para las conductas de desplazamiento ($P < 0.0001$), que ambas aumentaron. Sin embargo, un análisis más detallado comparando el inicio de la fase de exposición al sonido aversivo y la mitad de esta, así como la comparación desde la mitad de esta fase y el final de la misma, encontró diferencias para muchos de los comportamientos. Por ejemplo, tanto el movimiento con olfateo ($P = 0.0007$) (Figura 6) como el movimiento sin olfateo ($P = 0.009$) se reducían entre los días 1 y el 5, pero se incrementaban de nuevo ambos entre los días 5 y 10, ($P < 0.0001$) y ($P = 0.0003$) respectivamente. De forma contraria, la inactividad aumentaba entre los días 1 y 5 ($P = 0.0002$), pero disminuía entre los días 5 y 10 ($P < 0.0001$) (Figura 7). Por otro lado, la posición de estar sentado se incrementaba entre los días 1 y 5 ($P = 0.02$) y se reducía de nuevo entre los días 5 y 10 ($P = 0.004$), justo al contrario que la posición de estar de pie y el *rearing*, que disminuían entre los días 1 y 5 ($P = 0.005$) y ($P = 0.05$), respectivamente, pero aumentaban entre los días 5 y 10, ($P = 0.0002$) y ($P = 0.004$). En definitiva, los animales, en global, reducían su actividad e incrementaban el tiempo que pasaban sentados al comparar el primer día de exposición al sonido y un día de la mitad de esta fase. No obstante, de la mitad para el final cambiaba el patrón incrementándose el movimiento y además permaneciendo los perros más tiempo de pie y a dos patas sobre las paredes de la sala. Viendo esta evolución era esperable no encontrar diferencias al comparar el día 1 y el día 10. Por último, al comparar el día 0 (habituación) y el 11 (último día sin exposición al sonido) se observó que, en general, se reducía el movimiento sin olfateo ($P = 0.03$) y la posición de *rearing* ($P = 0.005$) y aumentaba el tiempo que los perros pasaban inactivos ($P = 0.01$).

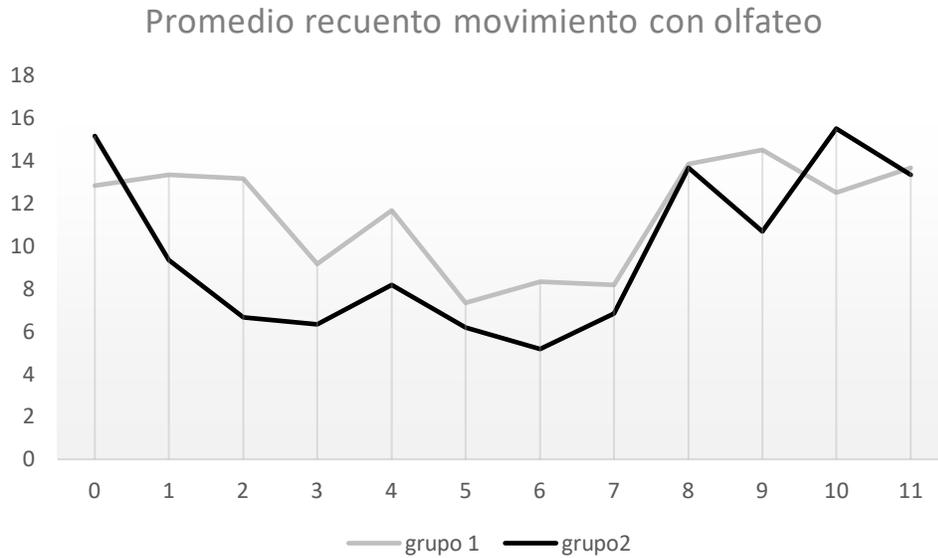


Figura 6. Comparación entre ambos grupos de los promedios del recuento del movimiento con olfateo en función del día. Se observa una evolución similar entre ambos grupos, registrándose una reducción entre el inicio de la fase de exposición al estímulo aversivo y la mitad de dicha fase y un incremento entre la mitad y el final. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

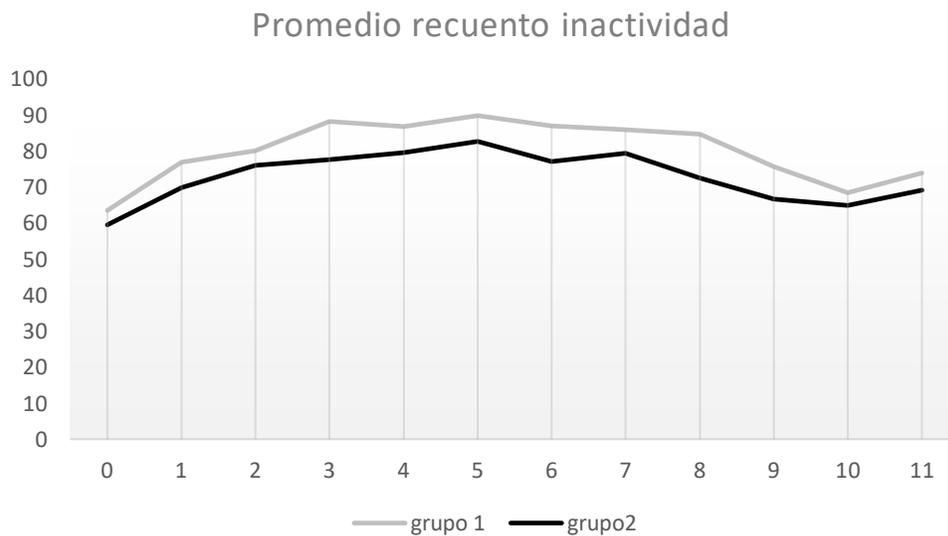


Figura 7. Comparación entre ambos grupos de los promedios del recuento de inactividad en función del día. Se observa una evolución muy similar entre ambos grupos, registrándose un incremento entre el inicio de la fase de exposición al estímulo aversivo y la mitad de dicha fase y una reducción entre la mitad y el final. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

3.2.1.3. Análisis detallado en presencia del sonido aversivo

Por otra parte, el análisis más detallado de la evolución del comportamiento a lo largo del experimental durante la exposición al sonido aversivo también sugirió algunos resultados que conviene comentar, en especial con respecto a los signos defensivos (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados expresados en el p-valor de la comparación entre los dos grupos en días concretos del estudio en cuanto al análisis de las conductas durante la exposición al sonido aversivo.

	Signos defensivos
Día 1	0.06
Día 5	0.18
Día 10	0.04

Los perros del grupo tratamiento (con predictibilidad) mostraron menos signos defensivos que los perros del grupo control (sin predictibilidad) el día 10 durante la exposición al sonido aversivo. Día 1: primer día de la fase de exposición al sonido; día 5: mitad de la fase de exposición al sonido; día 10: último día de la fase de exposición al sonido.

A continuación se revisaron las diferencias entre días para los signos defensivos observándose cambios significativos en global (sin tener en cuenta los grupos) al comparar días del inicio del estudio, la mitad y el final de este (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados expresados en el p-valor de la comparación global (sin considerar los grupos) entre días concretos en cuanto al análisis de las conductas durante la exposición al sonido aversivo.

	Signos defensivos
Días 1 y 5	0.12
Días 1 y 10	0.0001
Días 5 y 10	0.0003

Los signos defensivos no se redujeron en la comparación entre los días 1 y 5, sin embargo, sí lo hicieron entre los días 5 y 10, así como al comparar los días 1 y 10. Día 1: primer día de la fase de exposición al sonido; día 5: mitad de la fase de exposición al sonido; día 10: último día de la fase de exposición al sonido.

Tal y como ocurría con ciertas variables de movimiento y de postura revisados anteriormente, los signos defensivos analizados durante la exposición al sonido aversivo mostraron un cambio en el tiempo, reduciéndose a partir de la mitad del estudio (Figura 8). Además, cabe señalar que el último

día de la fase de exposición al sonido (día 10) se detectó una diferencia significativa entre ambos grupos, mostrando más signos defensivos los perros del grupo sin predictibilidad con respecto a los perros del grupo con predictibilidad ($P = 0.04$).

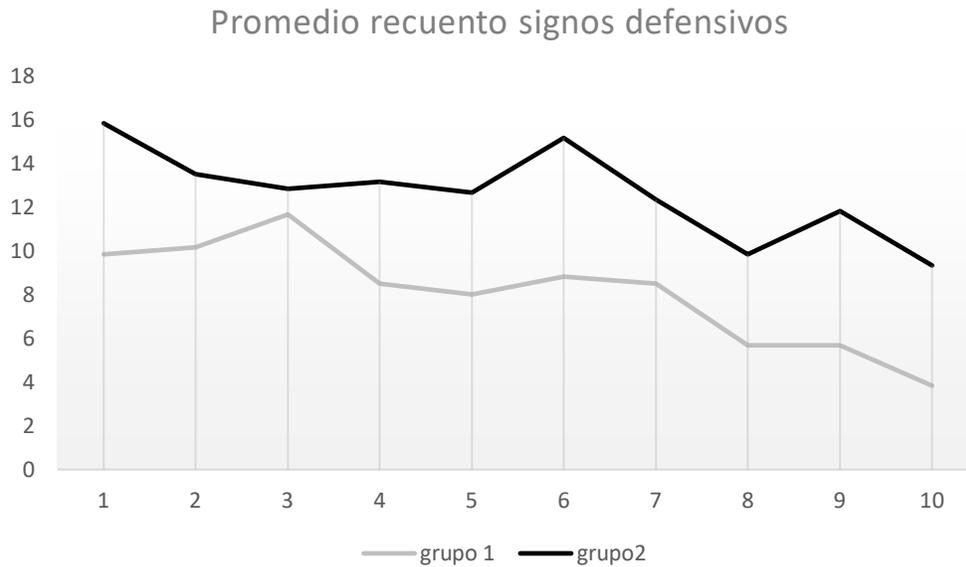


Figura 8. Comparación entre ambos grupos de los promedios del recuento de los signos defensivos en función del día en cuanto al análisis durante la exposición al sonido aversivo. Se observa una evolución similar entre ambos grupos, registrándose una reducción entre el inicio de la fase de exposición al sonido y el final de dicha fase. Grupo 1: tratamiento con predictibilidad; grupo 2: control sin predictibilidad.

3.2.2. Variables fisiológicas

Por último, no se halló ninguna diferencia significativa ($P = 0.38$) entre el cortisol inicial (5.20 ± 1.05 pg/mg) y el cortisol final (4.81 ± 1.03 pg/mg), así como tampoco se encontró ningún efecto del grupo ($P = 0.38$), ni de la interacción entre grupo y muestra ($P = 0.83$).

Tabla 13. Valor promedio y SD de las concentraciones de cortisol en pelo en cada uno de los muestreos en el grupo control (sin predictibilidad) y en el grupo tratamiento (con predictibilidad).

	Grupo control (sin predictibilidad)	Grupo tratamiento (con predictibilidad)
Muestreo 1	5.44 ± 1.29 pg/mg	4.96 ± 0.79 pg/mg
Muestreo 2	4.96 ± 1.21 pg/mg	4.66 ± 0.89 pg/mg

SD = Desviación estándar.

4. DISCUSIÓN

4.1. Respuestas conductuales y fisiológicas inducidas por la exposición a una situación estresante

Son numerosos los trabajos que han analizado las respuestas conductuales y fisiológicas de los perros al ser sometidos a diferentes estresores (Engeland et al., 1990; Beerda et al., 1997; Rooney et al., 2007; Siniscalchi et al., 2013; Gruen et al., 2015). De igual modo, son numerosos también los diversos protocolos que utilizan los investigadores, así como las variables comportamentales que incluyen para su estudio. Relacionado con esto, la elección del estímulo aversivo que empleamos en ambos experimentos se ha usado antes ampliamente en la especie canina (Bueno et al., 1989; Gue et al., 1989; Engeland et al., 1990; Beerda et al., 1998; Araujo et al., 2013).

En el caso de los dos estudios de este capítulo se empleó una adaptación del modelo de Araujo y colaboradores (2013). En dicho estudio tomaron como medidas conductuales la distancia recorrida, la inactividad, el *grooming*, el olfateo, el *rearing* y la micción. El análisis de sus datos arrojó que la inactividad – que resultó ser la medida más robusta y confiable – se incrementaba durante la exposición al sonido de tormenta en comparación con los momentos en los que no se aplicaba este estímulo. Sin embargo, la distancia recorrida no se veía afectada. En este sentido, los investigadores atribuyeron el aumento en la duración de la inactividad durante la fase de aplicación del sonido principalmente a un aumento en el comportamiento de congelación (Araujo et al., 2013). De forma similar, en otro estudio en el que utilizaron este mismo modelo interpretaron la duración de la inactividad y la distancia recorrida en cada una de las fases como medidas de ansiedad (DePorter et al., 2012). Por otra parte, en otro estudio en el que emplearon el test de *open field* en perros – sin aplicación de estímulos sonoros aversivos – usaron como medidas conductuales la locomoción, la inactividad, el *grooming*, el olfateo, el *rearing*, la micción, la vocalización y los saltos (Siwak et al., 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en nuestro caso se decidió analizar como parámetros comportamentales el *freezing*, la locomoción, el *rearing*, el olfateo, la vocalización, el *grooming* y la conducta de eliminación. Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, en nuestro estudio piloto encontramos algunas diferencias significativas entre los dos grupos. Concretamente, en la conducta de *grooming* durante la fase anticipatoria – siendo el grupo con predictibilidad el que la mostraba en mayor medida –, así como en la conducta de *rearing* – siendo superior en el grupo con predictibilidad – y en la de olfateo – en este caso mostrándola en mayor medida el grupo sin predictibilidad –, ambas en la fase de exposición al sonido aversivo. No obstante, cabe señalar que la interpretación de estos

comportamientos puede ser complicada. Por ejemplo, con respecto al *grooming*, en un estudio en el que 23 perros con problemas relacionados con la separación fueron grabados en sus casas cuando se quedaban solos, encontraron que este comportamiento no se observó ni una sola vez. Este hallazgo, unido a otros resultados que obtuvieron, los llevó a sugerir que esto era compatible con un estado de ansiedad. Sin embargo, se debe indicar también que algunos autores proponen que el *grooming* puede constituir una actividad de desplazamiento (Voith, 1988). En cuanto al *rearing*, se considera en general parte del comportamiento exploratorio (Carli et al., 1989). Aun así, conviene destacar que este test no puede diferenciar la postura erguida sobre las dos patas traseras como parte de la conducta exploratoria o como expresión del afrontamiento activo de los animales en una situación de estrés. De forma similar, el olfateo puede considerarse un elemento de la conducta exploratoria. En relación con esto, conviene tener en cuenta que la exploración con frecuencia se basa en la presencia de estímulos novedosos en el ambiente (Crusio, 2001). Con lo cual, en nuestros estudios este comportamiento pudo verse afectado por el incremento gradual de la familiaridad de los perros con la sala de experimentación. Además, de nuevo, el test de *open field* no puede distinguir la actividad motora – que puede formar parte de la actividad espontánea o de la conducta de escape – del comportamiento exploratorio del entorno (Siwak et al., 2001). Por tanto, la interpretación de estos parámetros puede ser ambigua e insuficiente para determinar un posible efecto de la predictibilidad en la respuesta de los animales.

En otro orden de ideas, más allá de lo complicada que puede resultar la interpretación de las medidas conductuales, también la recolección de los datos relacionados con estas variables puede ser compleja. Un ejemplo de ello lo constituye la inacción o inactividad. Landsberg y colaboradores definieron la inactividad como “el tiempo pasado en un estado inactivo, tanto en posición sentada como acostada y sin participar en ningún otro comportamiento” (Landsberg et al., 2015). Nuevamente, se trata de un comportamiento ambiguo cuya definición precisa es fundamental para una interpretación correcta. Por ejemplo, aunque esta inacción es interpretada con frecuencia como *freezing* o congelamiento, ni siquiera hay una definición unificada sobre este concepto. Las posibles consecuencias de esta falta de consenso se vieron reflejada de forma evidente en los dos estudios de este capítulo, pues se obtuvieron diferencias importantes de frecuencia de aparición del *freezing* en función de la descripción empleada. En el primer estudio se definió como la ausencia de cualquier conducta dirigida, lo cual llevó a que se registrara la aparición de este comportamiento en todas las fases experimentales. Es decir, tanto en presencia como en ausencia del estímulo aversivo. Asimismo, resultó ser el comportamiento que con más frecuencia exhibieron los animales. En el caso del segundo estudio, la adición de un matiz con relación a la rigidez general del cuerpo redujo en gran

medida la observación de esta conducta, de manera que únicamente apareció en cantidad suficiente como para ser analizada en los momentos de exposición al estímulo sonoro. Esta discriminación entre inactividad y *freezing* que se estableció en el segundo estudio cuadra más con las teorías de Jeffrey Gray y Neil McNaughton. Estos investigadores proponen la existencia de un estado central de inhibición del comportamiento en situaciones de incertidumbre en las que se produce un conflicto entre la necesidad de aproximarse y la de evitar (Gray and McNaughton, 2000). Robert y Caroline Blanchard proponen una concepción similar, pero centran la diferencia entre la congelación y lo que ellos llaman la inactividad defensiva en el estímulo amenazante, básicamente en cuanto si este es real o potencial (Blanchard and Blanchard, 1989). En contraste, el enfoque de Gray y McNaughton pone el énfasis en los patrones de comportamiento y sus funciones. De esta manera, cuando el objeto de las acciones del animal es alejarse de la fuente de peligro se activaría el sistema de lucha, huida y congelación. Por otro lado, cuando el objetivo es uno que requiere moverse hacia la fuente de peligro – entrando así en conflicto – se activaría el sistema de inhibición del comportamiento. La distinción entre la amenaza potencial y real estaría altamente correlacionada con la activación de estos sistemas, tal y como proponen los Blanchard, pero no sería una condición necesaria. De esta manera, Gray y McNaughton no equiparan la congelación con la inhibición conductual aunque ambos términos se caracterizan por la ausencia de comportamiento. En concreto, ven el *freezing* como parte integral del conjunto de patrones de comportamiento que retiran al animal de una situación peligrosa y, por su parte, utilizan el término de inhibición conductual para indicar que efectivamente se está inhibiendo una forma de comportamiento de aproximación, pero que, además, va acompañada a menudo de una evaluación de riesgo activa (Gray and McNaughton, 2000). Como señala LeDoux, en este tipo de estrategia de evitación pasiva el daño se previene reteniendo una respuesta, por lo que puede resultar complicada de distinguir de la congelación si únicamente se está observando el comportamiento (LeDoux, 2015). Sin embargo, desde otros niveles es posible diferenciarlas. Por ejemplo, algunos medicamentos como las benzodiazepinas parecen reducir la evitación pasiva pero no afectan a la congelación frente un estímulo concreto (Gray and McNaughton, 2000; LeDoux, 2015). También se han señalado ligeras diferencias en la corporalidad adoptada – hablando de roedores –, puesto que una postura en la que el individuo estira hacia delante la cabeza y los hombros seguidos de una retracción de la misma (*stretch attend postures*) no se veía en un congelamiento verdadero (Gray and McNaughton, 2000). Al mismo tiempo, conceptualmente son fenómenos diferentes, pues el *freezing* representa un patrón de reacción fijo defensivo y la evitación pasiva se considera más bien una acción instrumental que se aprende por sus consecuencias (LeDoux and Daw, 2018). Es decir, cuando es imposible escapar o esconderse la inmovilidad es el único método efectivo para evitar

riesgos (Blanchard, 1988). En este marco, conviene evidenciar que en nuestros dos estudios los animales realmente no disponían de opciones para dar respuestas activas que les permitiera escapar o evitar el estímulo aversivo. Por tanto, la inactividad que mostraron durante los periodos en los que no fueron expuestos al sonido podría representar este fenómeno. Aun así, como se adelantaba, no siempre se podrá distinguir inequívocamente ambos sistemas desde el punto de vista conductual, pues en fases iniciales del patrón de respuesta ante una amenaza potencial se puede producir una forma de inhibición conductual de alta intensidad que es muy similar a la congelación, aunque neuronalmente diferente (Gray and McNaughton, 2000).

En el segundo estudio del capítulo, además de los comportamientos relacionados con la actividad, las vocalizaciones y la conducta de eliminación, tras una revisión de la bibliografía existente se incluyeron otras categorías de comportamiento. Entre ellas, una categoría con diferentes posturas (Lefebvre et al., 2010; Konok et al., 2011; Protopopova et al., 2014), una de signos defensivos (Engeland et al., 1990; Palestrini et al., 2010; Siniscalchi et al., 2013; Travain et al., 2015) y otra de conductas de desplazamiento (Beerda et al., 1997; Lund and Jørgensen, 1999; Scaglia et al., 2013; Protopopova et al., 2014; Travain et al., 2015). No obstante, cabe subrayar que el registro de una gran cantidad de comportamientos puede dificultar la validación estadística (Beerda et al., 1998). Igualmente, tal y como se ha comentado en cuanto a la valoración de los parámetros comportamentales en el estudio piloto, el análisis de estas variables puede ser complicado. Por poner un ejemplo, en un estudio en el que se compararon los comportamientos de perros diagnosticados con problemas relacionados con la separación y perros que no presentaban estos problemas, Scaglia y colaboradores encontraron en los segundos algunas de estas conductas (como las vocalizaciones, el *lip licking* o los bostezos) (Scaglia et al., 2013). Los investigadores apuntaron a que su aparición no es específica de este tipo de situaciones estresantes y que pueden desencadenarse por otros estímulos. De todas formas, también añadieron que cabía la posibilidad de que se estuviera subestimando el número de animales con estos trastornos.

En nuestro caso no se halló ninguna diferencia significativa entre los dos grupos para ninguna de las variables comportamentales analizadas en ausencia del sonido aversivo. Únicamente se detectó una diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto al análisis durante la exposición al estímulo aversivo el último día de la fase de exposición al sonido. Concretamente, los perros del grupo sin predictibilidad mostraron más signos defensivos con respecto a los perros del grupo con predictibilidad. En relación con estos resultados, cabe señalar que las observaciones conductuales pueden estar limitadas en la evaluación del estrés crónico. Entre otras razones porque el comportamiento en situaciones estresantes es bastante variable y no necesariamente específico de

estas, con lo cual la interpretación de este tipo de datos puede ser confusa (Beerda et al., 2000). Asimismo, las diferencias en los protocolos utilizados por los investigadores amplifican notablemente la diversidad en las respuestas conductuales de los perros expuestos a distintos estresores (Beerda et al., 1997), al igual que el hecho de que los entornos experimentales sean muy variados (domicilios, centros veterinarios, instalaciones de refugios y centros de investigación, entre otros). Por otra parte, algunos de los artículos presentan una descripción detallada y precisa de las variables comportamentales que incluyen y otros no, lo cual dificulta que se puedan integrar los datos de diferentes trabajos en una discusión. De forma similar, muchos estudios utilizan estas respuestas conductuales como medidas de miedo, de ansiedad y de estrés de forma indistinta. Todas estas diferencias a la hora de valorar el estrés pueden dificultar la comparación entre artículos (Basset and Buchanan-Smith, 2007).

Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento, parece evidente la importancia de combinar las medidas conductuales con parámetros fisiológicos con el objetivo de mejorar la interpretación de los datos de comportamiento. En este sentido, en el estudio de Engeland y colaboradores – en el que analizaron la respuesta fisiológica de perros expuestos a un estímulo sonoro intenso – encontraron un rápido aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial media, así como incrementos en la secreción adrenomedular y la conductancia vascular adrenal en comparación con el grupo control (Engeland et al., 1990). En otro estudio encontraron incrementos de la frecuencia cardiaca y de los niveles de cortisol en saliva en perros expuestos a ruido intenso a 95 decibelios, pero no a 70 y 87 decibelios (Beerda et al., 1997). Por su parte, Dreschel y Granger también reportaron un aumento de los niveles de cortisol en saliva en respuesta a estímulos acústicos (Dreschel and Granger, 2005). De forma específica, en cuanto al análisis del cortisol, en los últimos años las matrices acumulativas como el pelo han ganado protagonismo en la valoración de la actividad del eje HPA a largo plazo (Russell et al., 2012). En este aspecto, hay estudios que han demostrado la correlación entre las concentraciones de cortisol en pelo y en saliva o heces en el caso de los perros (Accorsi et al., 2008; Bennett and Hayssen, 2010; Bryan et al., 2013). Por su parte, Siniscalchi y colaboradores encontraron una relación entre los niveles de cortisol en pelo y algunas de las respuestas conductuales que analizaron en perros expuestos a diferentes estímulos acústicos (Siniscalchi et al., 2013). Aun así, cabe señalar que las relaciones entre el comportamiento inducido por estrés y las concentraciones del cortisol siguen sin estar claras (Rooney et al., 2007).

En nuestro caso se decidió complementar el análisis en el segundo estudio con la valoración de los niveles de cortisol en pelo. Sin embargo, no se halló ninguna diferencia significativa entre los niveles iniciales y finales de cortisol, así como tampoco se encontró ningún efecto del grupo. En relación con

estos resultados, es posible que las limitaciones metodológicas asociadas a la generación de predictibilidad, así como un probable efecto de adaptación de las respuestas de los animales y la influencia de la variabilidad individual, hayan lastrado la capacidad de detectar diferencias entre los grupos. Además, es posible que la comparación entre ambas muestras pueda resultar complicada, ya que la primera reflejó la acumulación de cortisol de meses mientras que la segunda únicamente de unas semanas. A pesar de ello, Grigg y colaboradores apuntan a que el hecho de que todos los perros hubieran permanecido en el mismo entorno los meses previos al estudio podría diluir este efecto (Grigg et al., 2017). En cualquier caso, una recomendación para futuros estudios consistiría en complementar el análisis de las medidas fisiológicas con otras valoraciones como la toma de muestras repetidas de cortisol salival o fecal, cambios en la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal, entre otros. Si bien, esto implicaría la recolección de un mayor número de muestras.

4.2. Efecto de la predictibilidad sobre la respuesta de estrés derivada de la exposición a un estímulo aversivo

Existe una extensa bibliografía acerca de las consecuencias de los ambientes imprevisibles (Mineka and Hendersen, 1985), incluidas la respuesta fisiológica exacerbada (Weiss, 1970; Seligman and Meyer, 1970; Mineka and Kihlstrom, 1978; Guile, 1987). Sin embargo, los estudios que han intentado relacionar la predictibilidad con medidas fisiológicas son poco consistentes en las conclusiones (Basset and Buchanan-Smith, 2007).

Conviene tener en cuenta que la predictibilidad es un concepto con múltiples dimensiones que permite la manipulación de varias características del estímulo aversivo (Shankman et al., 2011). Por ejemplo, el momento (cuándo va a aparecer), la duración (cuánto tiempo), la modalidad o tipo de evento aversivo y la intensidad, entre otros. En este sentido, la mayoría de los estudios se centran en manipular el momento de aparición, incluidos los del presente capítulo. En el estudio piloto se estableció la predictibilidad a través de un estímulo que señalaba la ocurrencia del evento aversivo. No obstante, de forma inconsciente – y con el objetivo de dar un cierto margen para poder observar las conductas de los perros durante la fase anticipatoria – se generó también una cierta previsibilidad temporal, pues el sonido aversivo nunca aparecía antes del primer minuto de estancia en el *open field*. Sin embargo, los resultados de un trabajo en el que analizaron tanto la previsibilidad temporal como la señalada sugerían que esta última podía ser más perceptible, o tal vez incluso de preferencia (Badia et al., 1975). En cualquier caso, en el segundo estudio se decidió aplicar el sonido en varias ocasiones de forma aleatoria dentro de cada sesión, con el objetivo de generar una imprevisibilidad mayor. Con

todo, Shankman y colaboradores advierten que el hecho de no poder predecir algunas de estas características – aun manipulándose una en concreto – podría influir en las respuestas que se observan en los individuos (Shankman et al., 2011). Con lo cual, cabe la posibilidad de que se redujera el posible efecto de la predictibilidad al anular por completo una de sus dimensiones, mermando la percepción de periodos seguros que permitiera atenuar las respuestas preparatorias.

Esto adquiere todavía más importancia si se tiene en cuenta la relación entre la capacidad de predecir y la de controlar como moduladores de los efectos de la estimulación aversiva en los animales (Dess et al., 1983; Maier, 1984; Mineka and Hendersen, 1985; Koolhaas et al., 2011). Ambos factores pueden influir en la manera en la que los individuos afrontan una situación estresante y tratan de reducir el impacto de los estresores (Armario, 2006). Como se adelantaba anteriormente, en el caso de nuestros estudios los perros no tenían forma de escapar o evitar la situación, con lo cual el comportamiento de los animales no alteraba la probabilidad de ocurrencia del evento estresante. En tal caso, la anticipación del sonido aversivo puede que no ayudara demasiado a los perros a hacer frente a la situación, al igual que se sugiere en otros estudios (Madaro et al., 2016). En consonancia con esto, Sapolsky subraya que la capacidad de predecir no siempre sirve de ayuda. Por ejemplo, en circunstancias en las que el agente estresante es inevitable su señalización no permitiría modificarlo, aunque sí favorecería cambiar en parte su percepción. Otras condiciones que podrían influir en la capacidad de la predictibilidad para proteger de las consecuencias negativas del estrés son la frecuencia y la intensidad del agente estresante (Sapolsky, 2004), así como los intervalos de tiempo entre la aparición de la señal predictiva y el estresor (Pitman et al., 1995). En este sentido, Sapolsky sugiere que cuando la señal predictiva aparece justo antes que el estresor apenas contribuiría a aliviar la anticipación psicológica (Sapolsky, 2004). Aparte de eso, hay investigadores que señalan la posibilidad de que muchos de los efectos atribuidos a la predictibilidad puedan deberse a incluir el control como parámetro experimental de forma inconsciente, generando una confusión entre los efectos de ambos (Bassett and Buchanan-Smith, 2007).

Existen varias explicaciones alternativas para la falta de diferencias en las comparaciones entre los grupos de nuestros estudios. Por un lado, es posible que no se haya generado un contraste en cuanto a la predictibilidad lo suficientemente robusto. En el primer estudio, tal y como señalábamos, la ausencia del estímulo aversivo de forma sistemática durante el primer minuto pudo introducir previsibilidad temporal para los perros de ambos grupos. Además, tal y como se comentará a continuación, las señales predictivas contextuales – iguales también para los dos grupos – tal vez pudieron contribuir a diluir las diferencias en cuanto a la predictibilidad generada. Con respecto al segundo estudio, es posible que, en un intento de establecer una imprevisibilidad más sólida

aplicando el estímulo aversivo en múltiples ocasiones dentro de cada sesión, se anulara por completo una de las dimensiones de la predictibilidad (la temporal). De esta forma pudo reducirse la percepción de periodos seguros, influyendo en las respuestas de los individuos del grupo tratamiento y diluyendo nuevamente las diferencias. Por otro lado, pudo haber variables que no controlamos y que pudieron complicar el análisis aún más: como la adaptación al estrés repetido y las diferencias individuales en las respuestas a los estresores, ambas comentadas con detalle a continuación.

4.3. Limitaciones metodológicas

4.3.1. Efecto del contexto

Resulta de por sí complicado definir qué constituye el contexto en una situación experimental, pues son numerosos los estímulos que lo pueden componer (Fanselow, 2007). En cualquier caso, a grandes rasgos el contexto constituiría un estímulo de duración relativamente larga que incorpora aquellos que deben ser aprendidos, tanto los condicionados como los discriminativos (Bouton, 2010). De forma específica, en los dos estudios del presente capítulo se alteraba la rutina de los perros y se hacía un recorrido por zonas por las que habitualmente no transitaban. Además, los propios investigadores, los alrededores de la nave en la que se desarrollaron los estudios, la sala de experimentación y todos sus elementos constituyentes podrían formar parte de ese concepto amplio de contexto. Esto conviene tenerlo en cuenta, pues a través del aprendizaje asociativo se restringe el número de estímulos que pueden provocar respuestas defensivas y, en definitiva, se obtiene previsibilidad con respecto a los posibles eventos del entorno (Grillon, 2002). De hecho, hay autores que sugieren que el contexto puede provocar respuestas del mismo modo que cualquier otro estímulo condicionado y, por tanto, competir por el control de la conducta (Bouton, 2010). En nuestros estudios todos los perros, con independencia del grupo, estaban expuestos a estas alteraciones de la rutina, así como a zonas, personas y estímulos en general que podían acabar generando una considerable predictibilidad previa a las sesiones.

4.3.2. Diferencias individuales

Son numerosos los estudios que han detectado diferencias individuales en perros en las respuestas conductuales a los estresores (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998; Hiby et al., 2006; Rooney et al., 2007; Åkerberg et al., 2012; Titulaer et al., 2013; Part et al., 2014; Landsberg et al., 2015; Grigg et al., 2017), así como en las respuestas defensivas en general (para una revisión mirar Boissy, 1995). Por poner un ejemplo concreto, en dos estudios que utilizaron el modelo en el que se basó el que

empleamos nosotros hallaron diferencias en cuanto a la actividad, de manera que en una ocasión los perros mostraron una reducción de esta en respuesta al estímulo aversivo sonoro (Araujo et al., 2013) y en otra, en cambio, algunos animales mostraron un aumento y otros una disminución en respuesta al sonido (Landsberg et al., 2015). Incluso, en un trabajo en el que los perros eran individuos relacionados que permanecían en las mismas condiciones de alojamiento y que estaban sujetos al mismo manejo, encontraron una variación considerable en la locomoción y en el consumo de alimentos tras la exposición a situaciones estresantes (Åkerberg et al., 2012). Por su parte, Rooney y colaboradores (2007) encontraron muy poca correlación entre el comportamiento y las medidas fisiológicas a pesar de haber utilizado un grupo de perros de aparente homogeneidad en cuanto a raza, sexo e historial de crianza. Los propios investigadores proponen que esto posiblemente se deba a variaciones genéticas y sutiles diferencias ontogénicas que llevan a la diversidad en el temperamento de los animales (Rooney et al., 2007). En relación con esto, en un curioso estudio con ratones genéticamente idénticos a los que alojaron tres meses en un mismo ambiente enriquecido, los investigadores observaron cómo estos acabaron divergiendo con el tiempo, mostrando importantes diferencias individuales en el comportamiento y la estructura cerebral como consecuencia de pequeñas variaciones tempranas en buena medida fortuitas (Freund et al., 2013). Asimismo, estas variaciones individuales podrían trasladarse incluso a la activación del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal (Siniscalchi et al., 2013). Por otra parte, conviene tener en cuenta que varios de los perros que participaron en nuestros estudios mostraban lo que suele denominarse un temperamento temeroso (Jones and Gosling, 2005). Todos ellos fueron criados en instalaciones de centros de cría, con lo cual es probable que no tuvieran contacto con una amplia diversidad de ambientes y de estímulos durante los periodos sensibles de desarrollo. En este aspecto, se sabe que los comportamientos defensivos cambian a lo largo del desarrollo (Wiedenmayer, 2009), adquiriendo especial relevancia la ontogenia temprana. Es razonable pensar que esto también pudo influir en los resultados que obtuvimos.

En definitiva, la variabilidad en las respuestas puede complicar la interpretación del comportamiento de los animales en situaciones estresantes (Beerda et al., 1997). Aparte, el efecto de estas diferencias individuales se evidencia especialmente en los estudios con tamaños de muestra pequeños como los nuestros. Con lo cual, en un intento de rebajar el impacto de dicha variabilidad y de reducir el riesgo de malinterpretar las mediciones de estrés, se recomienda valorar múltiples parámetros fisiológicos y conductuales (Beerda et al., 1997; Hiby et al., 2006).

4.3.3. Habitación

Con frecuencia se observa la reducción de algunas de las respuestas biológicas típicas del estrés al exponer a los animales de forma repetida a las situaciones estresantes (Armario, 2006). Se trata de un patrón sólido en la literatura con diferentes tipos de estímulos y en múltiples especies (Bhatnagar and Meaney, 1995; Head et al., 1997; García et al., 2000; Jaferi et al., 2003; Matsunaga and Watanabe, 2010). En este sentido, Koolhaas y colaboradores señalan que es fácil que se produzca una adaptación en los modelos de estrés crónico que utilizan estímulos aversivos agudos e intermitentes, entre otras cosas porque la exposición repetida puede llevar en sí misma un incremento de la previsibilidad (Koolhaas et al., 2011). En un estudio en el que utilizaron el modelo cuya modificación empleamos nosotros, describieron habitación en los cinco días que duró el trabajo. De igual modo, también encontraron cambios fisiológicos consistentes con este fenómeno, fundamentalmente las variaciones en las frecuencias cardíacas (Gruen et al., 2015). Sin embargo, cabe señalar que hay investigadores que sugieren que esta adaptación al estrés repetido no cumpliría con algunas de las reglas relacionadas con los mecanismos de habitación (Martí and Armario, 1998; Armario, 2006). Por su parte y de modo similar, Grissom sugiere que la disminución gradual de la magnitud de la respuesta fisiológica en las exposiciones repetidas a estresores reflejaría un proceso adaptativo que no cumple con todos los criterios del concepto de habitación como aprendizaje no asociativo simple, sino que implicaría mecanismos potencialmente más complejos (Grissom and Bhatnagar, 2009).

Nuestros resultados son consistentes con este fenómeno de adaptación. De forma concreta, el análisis detallado de los datos reveló claramente como determinadas conductas – como las variables de actividad (movimiento con y sin olfateo, así como la inactividad) y los signos defensivos – mostraron un cambio con el tiempo, reduciéndose a partir de la mitad del estudio.

4.3.4. Tamaño de la muestra

Lógicamente nuestra muestra no es representativa de la población canina en su conjunto, pues se trata estudios pequeños y de perros de la misma raza. Además, como se ha adelantado, el pequeño tamaño muestral dificulta la capacidad para detectar efectos significativos debido a la propia variación dentro de cada grupo.

5. CONCLUSIONES

En el caso de nuestros estudios no se ha podido demostrar claramente que la capacidad de anticipar el estresor pueda reducir la respuesta de estrés. Como se ha sugerido, esto podría deberse a que la previsibilidad tiene un efecto limitado en este modelo, a restricciones metodológicas o incluso una combinación de ambos. En conclusión, los estudios que investigan los efectos de la predictibilidad sobre las respuestas conductuales y fisiológicas pueden ser complejos a nivel experimental y confusos en las interpretaciones de los resultados.

Por otra parte, se ha subrayado la importancia de interpretar con cautela los parámetros de comportamiento debido a la variabilidad que existe en las respuestas conductuales de los animales al enfrentar situaciones estresantes. Incluso la combinación con medidas fisiológicas no siempre arroja resultados claros. En relación con esto, la comparación entre estudios puede verse dificultada como consecuencia de los diversos parámetros fisiológicos y conductuales que se utilizan para valorar el estrés. Además, las definiciones sutilmente distintas que se pueden encontrar en la bibliografía también pueden complicar la integración de los resultados de diferentes trabajos.

6. REFERENCIAS

- Abbott, B., & Badia, P. (1979). Choice for signaled over unsignaled shock as a function of signal length. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 32(3), 409–417. doi: 10.1901/jeab.1979.32-409
- Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., & Seren, E. (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology*, 155(2), 398–402. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.07.002
- Åkerberg, H., Wilsson, E., Sallander, M., Hedhammar, Å., Lagerstedt, A.-S., Larhammar, D., & Meyerson, B. (2012). Test for personality characteristics in dogs used in research. *Journal of Veterinary Behavior*, 7(6), 327–338. doi: 10.1016/j.jveb.2012.01.007

Capítulo 1

- Amat, M., Camps, T., Le Brech, S., & Manteca, X. (2014). Separation anxiety in dogs: the implications of predictability and contextual fear for behavioural treatment. *Animal Welfare*, 23(3), 263–266. doi: 10.7120/09627286.23.3.263
- Amat, M., Camps, T., & Manteca, X. (2016). Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(8), 577–586. doi: 10.1177/1098612x15590867
- Amat, M., Camps, T., Le Brech, S., & Tejedor, S. (2018). *Manual práctico de etología clínica en el perro*. Barcelona: Multimedia ediciones veterinarias.
- Araujo, J. A., de Rivera, C., Landsberg, G. M., Adams, P. E., & Milgram, N. W. (2013). Development and validation of a novel laboratory model of sound-induced fear and anxiety in Beagle dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 8(4), 204–212. doi: 10.1016/j.jveb.2012.10.008
- Arhant, C., Bubna-Littitz, H., Bartels, A., Futschik, A., & Troxler, J. (2010). Behaviour of smaller and larger dogs: Effects of training methods, inconsistency of owner behaviour and level of engagement in activities with the dog. *Applied Animal Behaviour Science*, 123(3-4), 131–142. doi: 10.1016/j.applanim.2010.01.003
- Armario, A. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 5(5), 485–501. doi: 10.2174/187152706778559336
- Badia, P., Harsh, J., & Coker, C.C. (1975). Subjects choose fixed time over variable time shock and vice versa: shock distribution and shock-free time as factors. *Learning and Motivation*, 6, 264–278.
- Bamberger, M., & Houpt, K. A. (2006). Signalment factors, comorbidity, and trends in behavior diagnoses in dogs: 1,644 cases (1991–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(10), 1591–1601. doi: 10.2460/javma.229.10.1591
- Bassett, L., & Buchanan-Smith, H. M. (2007). Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3-4), 223–245. doi: 10.1016/j.applanim.2006.05.029
- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., & de Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 52(3-4), 307–319. doi: 10.1016/s0168-1591(96)01131-8

- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *58*(3-4), 365–381. doi: 10.1016/s0168-1591(97)00145-7
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*, *9*(1), 49-62.
- Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, *39*(3), 171–180. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.04.003
- Bhatnagar, S., & Meaney, M. J. (1995). Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *7*(2), 97–108. doi: 10.1111/j.1365-2826.1995.tb00672.x
- Blanchard, D. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, *39*(1), 43–68. doi: 10.1146/annurev.psych.39.1.43
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*, *103*(1), 70–82. doi: 10.1037//0735-7036.103.1.70
- Boissy, A. (1995). Fear and fearfulness in animals. *The Quarterly Review of Biology*, *70*(2), 165–191. doi: 10.1086/418981
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B. N., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *21*(6), 567–574. doi: 10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x
- Bouton, M. E. (2010). The multiple forms of context in associative learning. In: B. Mesquita, L. F. Barrett, E. Smith (Ed.), *The mind in context* (pp. 233-258). New York: The Guilford Press.
- Bryan, H. M., Adams, A. G., Invik, R. M., Wynne-Edwards, K. E., Smits, J. E. (2013). Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *52*(2), 189–196.

Capítulo 1

- Bueno, L., Gue, M., Fargeas, M. J., Alvinerie, M., Junien, J. L., & Fioramonti, J. (1989). Vagally mediated inhibition of acoustic stress-induced cortisol release by orally administered kappa-opioid substances in dogs. *Endocrinology*, *124*(4), 1788–1793. doi: 10.1210/endo-124-4-1788
- Cannas, S., Frank, D., Minero, M., Aspesi, A., Benedetti, R., & Palestini, C. (2014). Video analysis of dogs suffering from anxiety when left home alone and treated with clomipramine. *Journal of Veterinary Behavior*, *9*(2), 50–57. doi: 10.1016/j.jveb.2013.12.002
- Carli, M., Prontera, C., & Samanin, R. (1989). Effect of 5-HT_{1A} agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: Evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology*, *28*(5), 471–476. doi: 10.1016/0028-3908(89)90081-6
- Casal, N., Manteca, X., Peña L, R., Bassols, A., & Fàbrega, E. (2017). Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs. *Journal of Veterinary Behavior*, *19*, 1–6. doi: 10.1016/j.jveb.2017.01.002
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, *5*(7), 374–381. doi: 10.1038/nrendo.2009.106
- Crusio, W. E. (2001). Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behavioural Brain Research*, *125*(1-2), 127–132. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00280-7
- Denenberg, S., Landsberg, G. M., Horwitz, D., & Seksel, K. (2005). A comparison of cases referred to behaviorist in three different countries. In: D. Mills, E. Levine, G. Landsberg, D. Horwitz, M. Duxbury, P. Martens, K. Meyer, L. Radosta-Huntley, M. Reich, J. Willard (Ed.), *Current Issues and Research in Veterinary Behavioral Medicine* (pp. 56-62). West Lafayette: Purdue University Press.
- DePorter, T. L., Landsberg, G. M., Araujo, J. A., Ethier, J. L., & Bledsoe, D. L. (2012). Hormonease Chewable Tablets reduces noise-induced fear and anxiety in a laboratory canine thunderstorm simulation: A blinded and placebo-controlled study. *Journal of Veterinary Behavior*, *7*(4), 225–232. doi: 10.1016/j.jveb.2011.05.024
- Dess, N. K., Linwick, D., Patterson, J., Overmier, J. B., & Levine, S. (1983). Immediate and proactive effects of controllability and predictability on plasma cortisol responses to shocks in dogs. *Behavioral Neuroscience*, *97*(6), 1005–1016. doi: 10.1037/0735-7044.97.6.1005

- Dreschel, N. A., & Granger, D. A. (2005). Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science*, *95*(3-4), 153–168. doi: 10.1016/j.applanim.2005.04.009
- Edwards, P. T., Hazel, S. J., Browne, M., Serpell, J. A., McArthur, M. L., & Smith, B. P. (2019). Investigating risk factors that predict a dog's fear during veterinary consultations. *Plos One*, *14*(7), e0215416. doi: 10.1371/journal.pone.0215416
- Engeland, W. C., Miller, P., & Gann, D. S. (1990). Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *258*(3), R672-R677. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.3.r672
- Fanselow, M. S. (1980). Signaled shock-free periods and preference for signaled shock. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *6*(1), 65–80. doi: 10.1037//0097-7403.6.1.65
- Fanselow, M. S. (2007). Context: What so special about it? In: H. L. Roediger III, Y. Dudai, S. M. Fitzpatrick (Ed.), *Science of Memory: Concepts* (pp. 101-105). Oxford: Oxford University Press.
- Foa, E. B., Zinbarg, R., & Rothbaum, B. O. (1992). Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: An animal model. *Psychological Bulletin*, *112*(2), 218–238. doi: 10.1037/0033-2909.112.2.218
- Fourie, N. H., Brown, J. L., Jolly, C. J., Phillips-Conroy, J. E., Rogers, J., & Bernstein, R. M. (2016). Sources of variation in hair cortisol in wild and captive non-human primates. *Zoology*, *119*(2), 119–125. doi: 10.1016/j.zool.2016.01.001
- Freund, J., Brandmaier, A. M., Lewejohann, L., Kirste, I., Kritzler, M., Krüger, A., ... Kempermann, G. (2013). Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science*, *340*(6133), 756–759. doi: 10.1126/science.1235294
- Galhardo, L., Vital, J., & Oliveira, R. F. (2011). The role of predictability in the stress response of a cichlid fish. *Physiology & Behavior*, *102*(3-4), 367–372. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.11.035
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., & Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, *72*(2), 114–125. doi: 10.1159/000054578

Capítulo 1

- Gorman, J. M., Kent, J. M., Sullivan, G. M., Coplan, J. D. (2000). Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *American Journal of Psychiatry*, 157(4), 493–505. doi: 10.1176/appi.ajp.157.4.493
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press.
- Grigg, E. K., Nibblett, B. M., Robinson, J. Q., & Smits, J. E. (2017). Evaluating pair versus solitary housing in kennelled domestic dogs (*Canis familiaris*) using behaviour and hair cortisol: a pilot study. *Veterinary Record Open*, 4(1), e000193. doi: 10.1136/vetreco-2016-000193
- Grillon, C. (2002). Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. *Biological Psychiatry*, 52(10), 958–975. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01665-7
- Grillon, C., Baas, J. P., Lissek, S., Smith, K., & Milstein, J. (2004). Anxious responses to predictable and unpredictable aversive events. *Behavioral Neuroscience*, 118(5), 916–924. doi: 10.1037/0735-7044.118.5.916
- Grillon, C., Baas, J. M., Cornwell, B., & Johnson, L. (2006). Context conditioning and behavioral avoidance in a virtual reality environment: effect of predictability. *Biological Psychiatry*, 60(7), 752–759. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.072
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 215–224. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.001
- Gruen, M. E., Case, B. C., Foster, M. L., Lazarowski, L., Fish, R. E., Landsberg, G., ... Sherman, B. L. (2015). The use of an open-field model to assess sound-induced fear and anxiety-associated behaviors in Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(4), 338–345. doi: 10.1016/j.jveb.2015.03.007
- Gué, M., Peeters, T., Depoortere, I., Vantrappen, G., & Buéno, L. (1989). Stress-induced changes in gastric emptying, postprandial motility, and plasma gut hormone levels in dogs. *Gastroenterology*, 97(5), 1101–1107. doi: 10.1016/0016-5085(89)91678-8

- Guile, M. N. (1987). Differential gastric ulceration in rats receiving shocks on either fixed-time or variable-time schedules. *Behavioral Neuroscience*, *101*(1), 139–140. doi: 10.1037//0735-7044.101.1.139
- Hagenaars, M. A., Oitzl, M., & Roelofs, K. (2014). Updating freeze: Aligning animal and human research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 165–176. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.021
- Head, E., Callahan, H., Cummings, B. J., Cotman, C. W., Ruehl, W. W., Muggenberg, B. A., & Milgram, N. W. (1997). Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. *Physiology & Behavior*, *62*(5), 963–971. doi: 10.1016/s0031-9384(97)00198-4
- Hiby, E. F., Rooney, N. J., & Bradshaw, J. W. (2006). Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior*, *89*(3), 385–391. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.07.012
- Houpt, K. A., Honig, S. U., & Reisner, I. R. (1996). Breaking the human-companion animal bond. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *208*(10), 1653-1659.
- Jaferi, A., Nowak, N., & Bhatnagar, S. (2003). Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiology & Behavior*, *78*(3), 365–373. doi: 10.1016/s0031-9384(03)00014-3
- Jones, A. C., & Gosling, S. D. (2005). Temperament and personality in dogs (*Canis familiaris*): A review and evaluation of past research. *Applied Animal Behaviour Science*, *95*(1-2), 1–53. doi: 10.1016/j.applanim.2005.04.008
- Konok, V., Dóka, A., & Miklósi, Á. (2011). The behavior of the domestic dog (*Canis familiaris*) during separation from and reunion with the owner: A questionnaire and an experimental study. *Applied Animal Behaviour Science*, *135*(4), 300–308. doi: 10.1016/j.applanim.2011.10.011
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., De Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(5), 1291-1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003

Capítulo 1

- Kumar, V., Bhat, Z. A., & Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *68*(2), 175–183. doi: 10.1016/j.vascn.2013.05.003
- Landsberg, G. M., Mougeot, I., Kelly, S., & Milgram, N. W. (2015). Assessment of noise-induced fear and anxiety in dogs: Modification by a novel fish hydrolysate supplemented diet. *Journal of Veterinary Behavior*, *10*(5), 391–398. doi: 10.1016/j.jveb.2015.05.007
- Lloyd, J. (2017). Minimising stress for patients in the veterinary hospital: why it is important and what can be done about it. *Veterinary Sciences*, *4*(2), 22. doi: 10.3390/vetsci4020022
- LeDoux, J. E. (2015). *Anxious: Using the brain to understand and treat fear and anxiety*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E., & Daw, N. D. (2018). Surviving threats: neural circuit and computational implications of a new taxonomy of defensive behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(5), 269–282. doi: 10.1038/nrn.2018.22
- Lefebvre, D., Depiereux, E., Giffroy, J.-M., & Diederich, C. (2010). Research note: Installation of videorecording equipment had minimal effect on behavioral measurements in 14 kenneled military dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, *5*(1), 2–6. doi: 10.1016/j.jveb.2009.09.044
- Lejuez, C. W., Eifert, G. H., Zvolensky, M. J., & Richards, J. B. (2000). Preference between onset predictable and unpredictable administrations of 20% carbon-dioxide-enriched air: Implications for better understanding the etiology and treatment of panic disorder. *Journal of Experimental Psychology: Applied*, *6*(4), 349–358. doi: 10.1037//1076-898x.6.4.349
- Luescher, A. U., & Reisner, I. R. (2008). Canine aggression toward familiar people: a new look at an old problem. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *38*(5), 1107–1130. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.04.008
- Lund, J. D., & Jørgensen, M. C. (1999). Behaviour patterns and time course of activity in dogs with separation problems. *Applied Animal Behaviour Science*, *63*(3), 219–236. doi: 10.1016/s0168-1591(99)00011-8
- Macbeth, B. J., Cattet, M. R. L., Stenhouse, G. B., Gibeau, M. L., & Janz, D. M. (2010). Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears

- (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Canadian Journal of Zoology*, *88*(10), 935–949. doi: 10.1139/z10-057
- Madaro, A., Fernö, A., Kristiansen, T. S., Olsen, R. E., Gorissen, M., Flik, G., & Nilsson, J. (2016). Effect of predictability on the stress response to chasing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Physiology & Behavior*, *153*, 1–6. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.10.002
- Maier, S. F. (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *8*(3), 435–446. doi: 10.1016/s0278-5846(84)80032-9
- Maren, S. (2011). Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron*, *70*(5), 830–845. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.023
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 417–428. doi: 10.1038/nrn3492
- Marschner, A., Kalisch, R., Vervliet, B., Vansteenwegen, D., & Büchel, C. (2008). Dissociable roles for the hippocampus and the amygdala in human cued versus context fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, *28*(36), 9030–9036. doi: 10.1523/jneurosci.1651-08.2008
- Martí, O., & Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *16*(3-4), 241–260. doi: 10.1016/s0736-5748(98)00030-6
- Matsunaga, W., & Watanabe, E. (2010). Habituation of medaka (*Oryzias latipes*) demonstrated by open-field testing. *Behavioural Processes*, *85*(2), 142–150. doi: 10.1016/j.beproc.2010.06.019
- Mezinskas, J., Gliner, J., & Shemberg, K. (1971). Somatic response as a function of no signal, random signal, or signaled shock with variable or constant durations of shock. *Psychonomic Science*, *25*(5), 271–272. doi: 10.3758/bf03335872
- Mineka, S., & Kihlstrom, J. F. (1978). Unpredictable and uncontrollable events: A new perspective on experimental neurosis. *Journal of Abnormal Psychology*, *87*(2), 256–271. doi:10.1037/0021-843X.87.2.256

Capítulo 1

- Mineka, S., & Hendersen, R. W. (1985). Controllability and predictability in acquired motivation. *Annual Review of Psychology*, 36(1), 495–529. doi: 10.1146/annurev.ps.36.020185.002431
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: G.P. Moberg, J.A. Mench (Ed.), *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare* (pp. 1–21). Wallingford: CABI Publishing.
- Moberg, G. P., & Mench, J.A. (2000). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford: CABI Publishing.
- Moya, D., Schwartzkopf-Genswein, K. S., & Veira, D. M. (2013). Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. *Livestock Science*, 158(1-3), 138–144. doi: 10.1016/j.livsci.2013.10.007
- Overall, K. L. (2013). Abnormal canine behaviors. In: K. L. Overall (Ed.), *Manual of Clinical Behavioral Medicine for Dogs and Cats* (pp. 231-309). St. Louis: Elsevier Mosby.
- Palestrini, C., Minero, M., Cannas, S., Rossi, E., & Frank, D. (2010). Video analysis of dogs with separation-related behaviors. *Applied Animal Behaviour Science*, 124(1-2), 61–67. doi: 10.1016/j.applanim.2010.01.014
- Part, C. E., Kiddie, J. L., Hayes, W. A., Mills, D. S., Neville, R. F., Morton, D. B., & Collins, L. M. (2014). Physiological, physical and behavioural changes in dogs (*Canis familiaris*) when kennelled: Testing the validity of stress parameters. *Physiology & Behavior*, 133, 260–271. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.018
- Pastore, C., Pirrone, F., Balzarotti, F., Faustini, M., Pierantoni, L., & Albertini, M. (2011). Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 6(3), 188–194. doi: 10.1016/j.jveb.2011.01.001
- Pitman, D. L., Natelson, B. H., Ottenweller, J. E., McCarty, R., Pritzel, T., & Tapp, W. N. (1995). Effects of exposure to stressors of varying predictability on adrenal function in rats. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 767–776. doi: 10.1037//0735-7044.109.4.767
- Protopopova, A., Mehrkam, L. R., Boggess, M. M., & Wynne, C. D. L. (2014). In-kennel behavior predicts length of stay in shelter dogs. *PLoS ONE*, 9(12). doi: 10.1371/journal.pone.0114319

- Rooney, N. J., Gaines, S. A., & Bradshaw, J. W. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior, 92*(5), 847–854. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.06.011
- Rudy, J. W. (2009). Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning & Memory, 16*(10), 573–585. doi: 10.1101/lm.1494409
- Rudy, J. W., & O'Reilly, R. C. (1999). Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neuroscience, 113*(5), 867–880. doi: 10.1037//0735-7044.113.5.867
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology, 37*(5), 589–601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
- Sacks, J. J., Kresnow, M., & Houston, B. (1996). Dog bites: how big a problem? *Injury Prevention: journal of the International Society for Child and Adolescent Injury Prevention, 2*(1), 52–54. doi: 10.1136/ip.2.1.52
- Salman, M. D., New, J. J. G., Scarlett, J. M., Kass, P. H., Ruch-Gallie, R., & Hetts, S. (1998). Human and animal factors related to relinquishment of dogs and cats in 12 selected animal shelters in the United States. *Journal of Applied Animal Welfare Science, 1*(3), 207–226. doi: 10.1207/s15327604jaws0103_2
- Sapolsky, R. M. (2004). *Why zebras don't get ulcers*. New York: Owl Book/Henry Holt and Co.
- Scaglia, E., Cannas, S., Minero, M., Frank, D., Bassi, A., & Palestrini, C. (2013). Video analysis of adult dogs when left home alone. *Journal of Veterinary Behavior, 8*(6), 412–417. doi: 10.1016/j.jveb.2013.04.065
- Scarlett, J. M., Salman, M. D., New, J. J. G., & Kass, P. H. (1999). Reasons for relinquishment of companion animals in U.S. Animal shelters: selected health and personal issues. *Journal of Applied Animal Welfare Science, 2*(1), 41–57. doi: 10.1207/s15327604jaws0201_4
- Seligman, M. E., & Meyer, B. (1970). Chronic fear and ulcers in rats as a function of the unpredictability of safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology, 73*(2), 202–207. doi: 10.1037/h0030219

Capítulo 1

- Seligman, M. E., Maier, S. F., & Solomon, R. L. (1971). Unpredictable and uncontrollable aversive events. In: F. R. Brush (Ed.), *Aversive conditioning and learning* (pp. 347–400). New York: Academic Press.
- Shankman, S. A., Robison-Andrew, E. J., Nelson, B. D., Altman, S. E., & Campbell, M. L. (2011). Effects of predictability of shock timing and intensity on aversive responses. *International Journal of Psychophysiology*, *80*(2), 112–118. doi: 10.1016/j.ijpsycho.2011.02.008
- Sherman, B. L., & Mills, D. S. (2008). Canine anxieties and phobias: an update on separation anxiety and noise aversions. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *38*(5), 1081–1106. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.04.012
- Siniscalchi, M., Mcfarlane, J. R., Kauter, K. G., Quaranta, A., & Rogers, L. J. (2013). Cortisol levels in hair reflect behavioural reactivity of dogs to acoustic stimuli. *Research in Veterinary Science*, *94*(1), 49–54. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.02.017
- Siwak, C. T., Tapp, P. D., & Milgram, N. W. (2001). Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. *Learning & Memory*, *8*(6), 317–325. doi: 10.1101/lm.41701
- Smith, A. S., Lieberwirth, C., & Wang, Z. (2013). Behavioral and physiological responses of female prairie voles (*Microtus ochrogaster*) to various stressful conditions. *Stress*, *16*(5), 531–539. doi: 10.3109/10253890.2013.794449
- Takeuchi, Y., Houpt, K. A., & Scarlett, J. M. (2000). Evaluation of treatments for separation anxiety in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *217*(3), 342–345. doi: 10.2460/javma.2000.217.342
- Terwissen, C. V., Mastromonaco, G. F., & Murray, D. L. (2013). Influence of adrenocorticotrophin hormone challenge and external factors (age, sex, and body region) on hair cortisol concentration in Canada lynx (*Lynx canadensis*). *General and Comparative Endocrinology*, *194*, 162–167. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.09.010
- Titulaer, M., Blackwell, E. J., Mendl, M., & Casey, R. A. (2013). Cross sectional study comparing behavioural, cognitive and physiological indicators of welfare between short and long term

- kennelled domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 147(1-2), 149–158. doi: 10.1016/j.applanim.2013.05.001
- Travain, T., Colombo, E. S., Heinzl, E., Bellucci, D., Previde, E. P., & Valsecchi, P. (2015). Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(1), 17–23. doi: 10.1016/j.jveb.2014.11.003
- Voith, V. L., & Marder, A. R. (1988). Canine behavioral disorders: Excessive grooming and self-licking. In: R. Morgan (Ed.), *Handbook of Small Animal Practice* (pp. 1038). New York: Churchill Livingstone.
- Weiss, J. M. (1970). Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosomatic Medicine*, 32(4), 397–408. doi: 10.1097/00006842-197007000-00008
- Wiedenmayer, C. P. (2009). Plasticity of defensive behavior and fear in early development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(3), 432–441. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.11.004
- Wiepkema, P.R., & Koolhaas, J.M. (1993). Stress and animal welfare. *Animal Welfare*, 2(3), 195–218.

CAPÍTULO 2

Uso potencial del análisis y la determinación del cortisol en pelo para valorar el estrés crónico en gatos, así como el éxito de las intervenciones realizadas

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de estrés puede definirse como el conjunto de respuestas fisiológicas y de comportamiento que resultan de una amenaza real o interpretada para la integridad fisiológica o psicológica de un individuo (McEwen, 2007). Con relación a las respuestas fisiológicas, la exposición a estresores conlleva la activación de dos sistemas neuroendocrinos: el eje hipotalámico-simpático-adrenomedular y el eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) (Romero and Butler, 2007; Habib et al., 2001). El análisis del posible impacto patológico del estrés clásicamente se ha centrado en el eje HPA.

Los animales domésticos pueden exponerse a numerosas situaciones estresantes en su día a día. En el caso concreto de los gatos, un factor determinante para ello parece ser la falta de conocimiento sobre el comportamiento normal de esta especie por parte de los propietarios (Bradshaw, 2018). Por otra parte, algunos autores dividen los factores estresantes que pueden afectar a los animales en el entorno doméstico en tres categorías: factores físicos, sociales y aquellos relacionados con el manejo de las personas (Amat et al., 2016). Particularmente en los gatos, algunas de las principales causas ambientales que generan estrés en esta especie incluyen los cambios en el entorno, los ambientes empobrecidos que impiden la manifestación de comportamientos naturales y necesarios, las relaciones sociales con las personas y otros animales, así como la falta de control y previsibilidad.

El estudio de los problemas de comportamiento en los que está implicado el estrés es importante por varios motivos. En primer lugar, las situaciones estresantes, fundamentalmente las sostenidas en el tiempo, pueden tener un marcado impacto negativo a nivel del bienestar del individuo (Broom and Johnson, 1993). En segundo lugar, el estrés parece contribuir al desarrollo de diferentes enfermedades, como la cistitis idiopática (Westropp and Buffington, 2004; Buffington et al., 2006; Defauw et al., 2011), las infecciones del tracto respiratorio superior (Tanaka et al., 2012), o las patologías dermatológicas (Virga, 2003), entre otras. Por último, el estrés, además de favorecer la aparición de múltiples conductas problemáticas, también puede limitar la eficacia de las medidas terapéuticas planteadas para controlar dichas conductas, con lo cual puede contribuir a una peor evolución de los casos. Esta cuestión adquiere gran trascendencia al tener en cuenta que los problemas de comportamiento pueden constituir un riesgo potencial para el vínculo humano-animal y que además son una causa frecuente de abandono y eutanasia en las especies domésticas (Edney, 1998; Salman et al., 2000).

Los cambios que el estrés puede generar a nivel comportamental son numerosos y pueden tener manifestaciones muy diferentes. Desde la inhibición del comportamiento normal del gato a alteraciones más evidentes que pueden ser peligrosas para las personas, otros animales o el propio individuo, así como aquellas que pueden resultar molestas para los propietarios. En el primero de los supuestos, las manifestaciones conductuales derivadas de la situación de estrés consisten habitualmente en que los gatos pasan gran parte del tiempo escondidos, juegan menos y se reducen los comportamientos exploratorios y afiliativos (Amat et al., 2016). Debido a que estos cambios del comportamiento normal del gato son relativamente sutiles, es fácil que pasen desapercibidos para los propietarios. Con lo cual, podría perpetuarse la situación estresante para el animal.

Teniendo en consideración los motivos previamente mencionados, resulta fundamental disponer de indicadores adecuados para medir y evaluar científicamente los efectos del estrés en esta especie. Desde la perspectiva fisiológica el indicador más utilizado para valorar la respuesta de estrés es la concentración de glucocorticoides como representación de la actividad del eje HPA. Sin embargo, cabe señalar que, a diferencia de los biomarcadores de estrés agudo, actualmente no se dispone de ningún marcador biológico suficientemente fiable de estrés crónico. Entre otras cuestiones, debido a su etiología compleja y la gran variabilidad individual en sus manifestaciones (Russell et al., 2012). En relación con el cortisol, existen diferentes matrices para detectar sus concentraciones, como el plasma, la saliva, las heces o el pelo, entre otras. En este sentido, desde hace unos años las matrices acumulativas como el pelo han ganado protagonismo en la valoración de la actividad del eje HPA a largo plazo (Russell et al., 2012) y se están utilizando cada vez más en estudios en humanos y en investigación sobre estrés y bienestar animal. La principal ventaja de este tipo de matrices es que extienden notablemente los límites de monitoreo del estrés en un solo muestreo. Asimismo, el pelo es fácilmente accesible (Koren et al., 2002), el método para la obtención de las muestras es poco invasivo y el almacenamiento y conservación de estas no requiere condiciones especiales (Talló, 2016). El hecho de poder reducir en gran medida el esfuerzo de tomar muestras repetidas – lo que ocurre con las de saliva o heces, por ejemplo – sin duda representa una ventaja metodológica. Por otra parte, los hallazgos de estudios que han demostrado en diferentes especies la correlación entre las concentraciones de cortisol en pelo y en saliva o heces (Davenport et al., 2006; Accorsi et al., 2008; Bennett and Hayssen, 2010; Bryan et al., 2013) apoyan el empleo de esta metodología. Además, aquellos trabajos que han llevado a cabo la aplicación repetida de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) con el objetivo de imitar la respuesta del eje HPA frente a los estresores recurrentes también se han utilizado para validar el análisis del cortisol en pelo como indicador de estrés a largo plazo (González-de-la-Vara et al., 2011; Terwissen et al., 2013). Con todo y con eso, cabe apuntar a que

actualmente existen pocos trabajos en la especie felina en los que se haya valorado la viabilidad del uso del pelo en la medición del cortisol como indicador de estrés crónico. No obstante, se han encontrado resultados prometedores en estudios que han explorado esta metodología en gatos domésticos como alternativa fiable a otras técnicas no invasivas en el monitoreo de la actividad del eje HPA (Accorsi et al., 2008).

Por último, no se dispone de parámetros fiables en el contexto de las consultas de la especialidad de la etología clínica para evaluar la respuesta de estrés de los animales y la evolución de estos durante la aplicación de los protocolos de tratamiento. Esto hoy por hoy únicamente se puede valorar de forma indirecta a través de indicadores comportamentales y de la valoración subjetiva del propietario. Por tanto, teniendo en cuenta la frecuencia de los problemas de comportamiento relacionados con el estrés en esta especie y sus posibles consecuencias, disponer de indicadores que implicaran metodologías poco invasivas y que permitieran un análisis objetivo de la evolución de los animales constituiría una herramienta de gran potencial. Por todo ello, parece importante comprobar si el uso de la medición del cortisol en pelo es viable en la valoración del estrés crónico en gatos.

En el presente trabajo se utilizó esta metodología en gatos que vivían en un ambiente doméstico. Los objetivos del estudio consistieron en tres cuestiones fundamentales. Por un lado, en (1) evaluar la relación entre la concentración de cortisol y una serie de variables del animal (el color del pelo, la edad y el sexo) y del ambiente (la composición del grupo social y las condiciones de alojamiento). Por otro lado, en (2) comprobar si los niveles de cortisol en pelo eran significativamente más altos en gatos que mostraban cambios de comportamiento relacionados con el estrés en comparación con los del grupo control. Y, por último, en (3) analizar si dichos niveles se reducían significativamente con las estrategias terapéuticas dirigidas a reducir el estrés.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Población de estudio

Setenta y siete animales (n=77) fueron incluidos en el estudio. De ellos, cuarenta y dos formaron parte del grupo tratamiento (n=42) y treinta y cinco del grupo control (n=35). Del total de animales que participaron en el estudio, treinta y uno fueron machos (31/77) y cuarenta y seis, hembras (46/77). Del total de machos, catorce formaron parte del grupo control (14/35) y diecisiete del grupo tratamiento (17/42). Con respecto al total de hembras, veintiuna estaban en el grupo control (21/35) y veinticinco en el grupo tratamiento (25/42). Setenta y dos gatos estaban castrados (72/77) y cinco de ellos no (5/77). Ocho animales (8/77) eran menores de un año, cuarenta y seis (46/77) tenían una edad comprendida entre uno y siete años y veintitrés (23/77) eran mayores de siete años. Con relación a las razas, había sesenta y tres gatos de la raza común europeo (66/77), tres siameses (3/77), dos cruces de siamés (2/77), cuatro persas (4/77), un bosque de Noruega (1/77) y un azul ruso (1/77). Además, se recogieron datos de la composición de animales en el domicilio, es decir, si convivían o no con otros gatos y si en la casa había animales de otras especies. Dieciséis gatos no vivían con otros individuos de la misma especie (16/77) y sesenta y uno de ellos, sí (61/77). Por otra parte, cuarenta gatos convivían con uno o más perros (40/77) y treinta y siete, no (37/77). En cuanto a las condiciones de alojamiento, cincuenta y ocho gatos no tenían acceso al exterior (*indoor*) (58/77) y diecinueve, sí (*outdoor*) (19/77). Por último, dos de los gatos tenían inmunodeficiencia felina (2/77), uno leucemia felina (1/77), a uno le faltaba una falange de una de las extremidades delanteras (1/77), una padecía problemas cardíacos y otra tenía hipertiroidismo (1/77).

2.2. Problemas de comportamiento

Los problemas de comportamiento relacionados con el estrés incluidos en este estudio fueron los siguientes: respuestas defensivas ante estímulos ambientales y en contextos sociales (tanto con personas como con otros animales), pica de origen comportamental, alopecia psicógena, problemas de eliminación derivados de una situación de estrés, problemas de agresividad entre gatos que convivían, problemas de agresividad hacia los propietarios y vocalizaciones excesivas. Lógicamente, en muchos de los casos se detectaron también otros cambios sutiles en el comportamiento como consecuencia de ese estado de estrés: la reducción de conductas normales como el juego, el comportamiento exploratorio, el marcaje facial y las conductas afiliativas, así como el incremento de conductas como la vigilancia o el permanecer escondido.

Todos los diagnósticos estuvieron basados en la entrevista a los propietarios por parte de un especialista en comportamiento, así como en la valoración *in situ* del propio entorno del animal.

2.3. Metodología

Todos los gatos del grupo tratamiento fueron pacientes del servicio de etología clínica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Algunos de los propietarios de estos gatos acudieron directamente al servicio como consecuencia del problema de su animal y otros a través de un anuncio que se publicó en diferentes lugares. De igual modo, los gatos del grupo control fueron seleccionados de entre aquellos cuyos propietarios se pusieron en contacto tras ver el anuncio. En todos los casos se realizaron tres visitas a lo largo de cuatro meses: una primera de diagnóstico y propuesta de pautas iniciales – en los animales del grupo tratamiento – o simplemente de recogida de datos – en los del grupo control –, así como dos sesiones de seguimiento. Todas las visitas las hizo un veterinario especialista en comportamiento en el domicilio del animal para evitar el estrés adicional asociado a la clínica veterinaria. En cada una de ellas se tomó una muestra de pelo de los gatos participantes. Este enfoque metodológico se basó en el abordaje *shave and reshave*, que consiste en afeitar un área concreta al comienzo del periodo de estudio y afeitar de nuevo ese mismo pelo que crece en los siguientes periodos (Meyer and Novak, 2012).

Cabe decir que de forma puntual el tiempo entre visitas se alargó ligeramente (hasta una semana) por cuestiones horarias del propietario. Por otro lado, en uno de los gatos solo transcurrió un mes y medio entre la primera y la segunda toma, recogándose en esta última una cantidad de pelo insuficiente como para que pudiera analizarse. En relación con esto, en cuatro animales más no se pudo analizar una de las tres muestras: en tres de ellos por haber una cantidad de pelo insuficiente y en otro debido a razones técnicas.

2.4. Muestreo del pelo

Se recogió alrededor de 250 mg de pelo por muestra. Son numerosos los estudios en animales que han revelado diferencias en la concentración de cortisol en pelo en función de la región anatómica (Macbeth et al., 2010; Terwissen et al., 2013; Moya et al., 2013; Fourie et al., 2016; Casal et al., 2017). Por este motivo, se estandarizó la región corporal de muestreo para todos los individuos, empleándose concretamente la cara externa del muslo. No obstante, en uno de los gatos, debido a que presentaba un problema de alopecia psicógena precisamente a nivel de las extremidades

posteriores, se tomaron las muestras en la zona de la nuca. En el primer muestreo se rasuraba una zona lo suficientemente amplia como para garantizar una cantidad suficiente de pelo en los siguientes sin sobrepasar los márgenes. Además, se hicieron fotografías en cada uno de los muestreos para facilitar la identificación de la zona exacta en la que rasurar en las siguientes visitas.

Por otra parte, para poder hacer el corte a nivel de la piel – cuestión importante para muestrear la mayor longitud de pelo posible sin arrastrar folículos pilosos – se utilizó una peladora. Esta era específica para gatos. La peculiaridad principal de este tipo de peladoras es que hacen menos ruido, con lo cual se facilita que el animal acepte la manipulación. La cuchilla se desinfectó con alcohol tras cada recolección de pelo y cada muestra fue identificada y almacenada a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz hasta que se llevó a cabo el análisis de todas ellas al final del estudio.

Por último, teniendo en cuenta que está descrito que las concentraciones de cortisol en pelo pueden variar en función del color de este (Bennet and Hayssen, 2010), se categorizó en tres opciones: claro (incluyendo pelos blancos y rubios) (n=13), intermedio (comprendiendo pelos de color amarronado y anaranjado) (n=14) y oscuro (englobando pelos de color negro o marrón muy oscuro) (n=50).

2.5. Análisis de las muestras

Todos los análisis de las muestras fueron realizados en el Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) (08193, Bellaterra, España).

2.6. Extracción y cuantificación del cortisol

Las muestras fueron lavadas con isopropanol durante 2.5 minutos tres veces. A continuación, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 36 horas aproximadamente y después se trituró el pelo en fragmentos de < 2 mm de longitud utilizando una peladora. Seguidamente se colocaron cincuenta miligramos del pelo triturado en un tubo Eppendorf y se añadió metanol. Tras 18 horas de agitación moderada a 30°C para la extracción de esteroides las muestras se centrifugaron y el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf y colocado en un calentador a 38°C. Una vez que el metanol se evaporó completamente, los extractos secos fueron reconstituidos con tampón EIA (inmunoensayos enzimáticos) provisto de un inmunoensayo competitivo ELISA (ensayo por

inmunoabsorción ligado a enzimas) para el cortisol (Neogen® Corporation Europe, Ayr, UK) y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la validación de los ensayos se evaluó la precisión, la linealidad y la exactitud. El coeficiente de variación intra e interensayo mostró una precisión de 5.74% y 11.61%, respectivamente, revelando una repetibilidad aceptable dentro del ensayo. La linealidad de la dilución mostró un $R^2 = 99.8\%$ y proporcionó una confirmación de que los extractos hormonales del pelo interactuaron con el anticuerpo del ensayo de una manera dependiente de la dosis y respaldando la suposición de que las características de unión al anticuerpo de las muestras estándar y del *pool* de muestras son similares. El porcentaje de recuperación promedio del test *spike-and-recovery* fue de $108.56 \pm 11.57\%$, lo que indica que ningún otro componente de los extractos de pelo interfiere de forma relevante con la estimación de la hormona cortisol. Finalmente, se observaron similitudes inmunológicas entre el cortisol estándar proporcionado por el kit EIA y el cortisol extraído del pelo de los gatos, ya que las curvas generadas por las muestras estándares y los *pool* de muestras mostraron desplazamientos paralelos y pendientes similares.

Según el fabricante, la sensibilidad de su kit de EIA de cortisol es de 0.32 pg de cortisol/mg de pelo y su reactividad cruzada del anticuerpo EIA con otros esteroides es la siguiente: prednisolona 47.4%, cortisona 15.7%, 11-desoxicortisol 15.0%, prednisona 7.83%, corticosterona 4.81%, 6 β -hidroxicortisol 1.37%, 17-hidroxiprogesterona 1.36%, desoxicorticosterona 0.94%. No se presentan los esteroides con una reactividad cruzada inferior al 0.06%.

Teniendo en cuenta todos los resultados de la validación y la información proporcionada por el fabricante de EIA, se puede concluir que la detección de cortisol en el pelo de gato por el kit comercial de EIA utilizado fue exitosa y fiable.

2.7. Análisis estadístico

En primer lugar, a los datos de los niveles de cortisol en pelo se les aplicó una transformación logarítmica para normalizarlos. A continuación, los datos de cortisol transformados se analizaron mediante el procedimiento MIXED de SAS (SAS.9.1. Institute, Inc., Cary, NC, EUA) con ajuste de Tukey para testar si eran significativos o no cada uno de los efectos incluidos en el modelo. Concretamente, el modelo empleado quedó de la siguiente manera: $Y_{ijk} = M_i + G_j + C_k + e_{ijk}$

Donde el dato de cortisol transformado (Y_{ijk}) era igual a un efecto de muestra (M_i), un efecto de grupo (G_j), un efecto de color (C_k) y el error que representa la variación de los factores no controlados por el modelo (e_{ijk}). El modelo también incluyó el animal como medida repetida a lo largo del periodo de estudio (*repeated steatment*).

Por último, las medias por mínimos cuadrados de los efectos fijos (LSMEANS) se utilizaron cuando el análisis de varianza indicó diferencias ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS

Por una parte, no se halló una influencia del sexo ($P = 0.56$), la edad ($P = 0.74$), u otras variables ambientales, como la presencia de gatos ($P = 0.51$) o perros ($P = 0.53$) en la casa y la posibilidad de acceder al exterior ($P = 0.13$) sobre las concentraciones de cortisol en pelo. Sin embargo, se encontró un fuerte efecto del color de la capa en las concentraciones de cortisol ($P < 0.0001$). En concreto, las diferencias se produjeron entre los pelos de color claro (3.25 ± 1.08 pg/mg), con niveles de cortisol más bajos que los pelos oscuros (4.70 ± 1.64 pg/mg) ($P < 0.0001$) y que los de tonalidades intermedias (4.44 ± 1.30 pg/mg) ($P < 0.0001$). No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre las categorías de color de pelo oscuro e intermedio ($P = 0.67$).

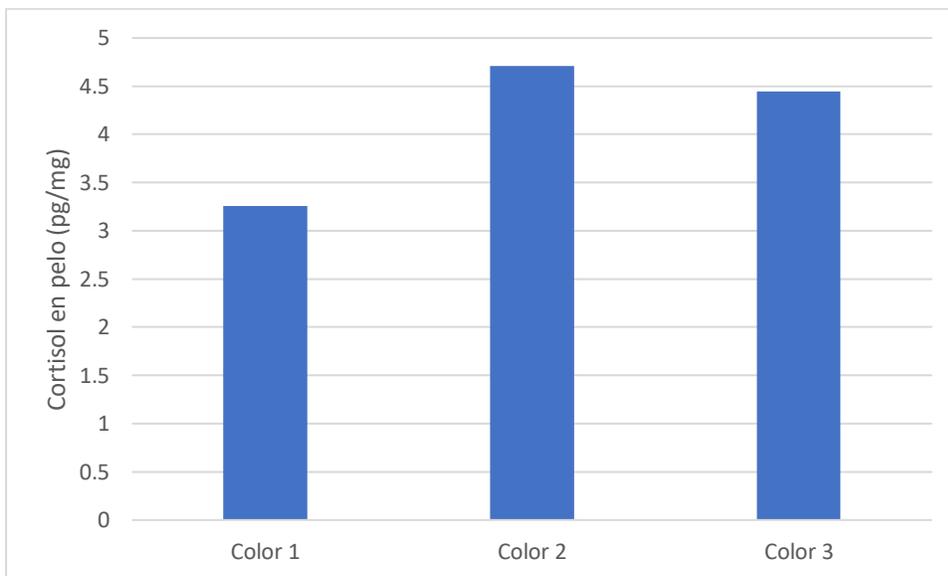


Figura 1. Niveles de cortisol según el color del pelo. Color 1: categoría de pelos de color claro, color 2: categoría de pelos oscuros; color 3: categoría de tonalidades intermedias.

Por otra parte, se encontró una tendencia en cuanto a las diferencias en los niveles de cortisol entre los grupos ($P = 0.05$). Concretamente nivel de cortisol en pelo tendió a ser mayor en el grupo de gatos que mostraban cambios de comportamiento relacionados con el estrés (4.65 ± 1.79 pg/mg) con respecto al grupo control (4.13 ± 1.28 pg/mg). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la evolución de los niveles de cortisol en el tiempo ($P = 0.59$). Por lo tanto, los valores por individuo se conservaron en gran medida. La Tabla 1 recoge los valores de los niveles de cortisol a lo largo de los tres muestreos en ambos grupos y la figura 2 muestra de forma clara lo constantes que se mantuvieron dichos niveles.

Tabla 1. Valor promedio y SD de las concentraciones de cortisol en pelo en cada uno de los muestreos en el grupo control y en el grupo tratamiento.

	Grupo control	Grupo tratamiento
Muestreo 1	4.25 ± 1.19 pg/mg	4.60 ± 1.43 pg/mg
Muestreo 2	4.11 ± 1.38 pg/mg	4.83 ± 2.03 pg/mg
Muestreo 3	4.02 ± 1.28 pg/mg	4.53 ± 1.89 pg/mg

SD = Desviación estándar.

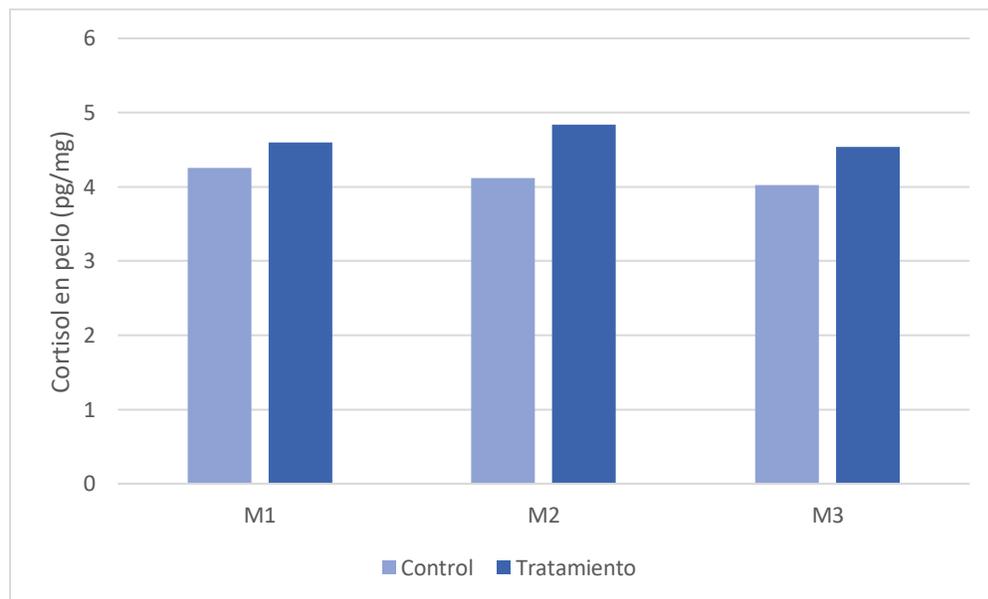


Figura 2. Niveles de cortisol en pelo en los tres muestreos tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento. M1: primer muestro; M2: segundo muestreo; M3: tercer muestreo.

4. DISCUSIÓN

4.1. Factores individuales y ambientales que pueden afectar a la concentración del cortisol en el pelo

Existen factores biológicos y ambientales que pueden influir en la secreción de glucocorticoides, lo cual exige un especial cuidado al interpretar la actividad del eje HPA y el estrés. A nivel metodológico se han descrito varios factores de confusión que podrían explicar diferencias sustanciales en el análisis del cortisol debido a que pueden afectar a su incorporación y retención en el pelo. Por ejemplo, hoy por hoy todavía hay cierto debate sobre el efecto del color del pelo en las concentraciones de esta hormona, encontrándose resultados contradictorios en la bibliografía. Concretamente, Bennett y Hayssen hallaron que el color de la capa tenía un impacto significativo en la concentración de cortisol, incluso dentro del mismo individuo. De tal manera que los pelos negros (eumelanina) tenían menos cortisol que los amarillos (feomelanina), mientras que los pelos agutí tenían una concentración intermedia (Bennet and Hayssen, 2010). De forma similar, otros estudios en animales han revelado una mayor concentración de esta hormona en pelo blanco con respecto al oscuro, como en ganado vacuno (González-de-la-Vara et al., 2011) y en chimpancés (Yamanashi et al., 2013). En contraste – y en consonancia con nuestros resultados – hay trabajos que sostienen que el color de pelo más oscuro está relacionado con niveles de cortisol más altos, tanto en humanos (Staufenbiel et al., 2015; Rippe et al., 2016; Binz et al., 2018), como en otros animales (Talló-Parra et al., 2015). Sin embargo, también existen estudios en los que no se ha encontrado ningún efecto del color del pelo en personas (Sauvé et al., 2007; Gao et al., 2010; Manenschijn et al., 2011; Dettenborn et al., 2012), y otros animales (Macbeth et al., 2010). No obstante, cabe puntualizar que en el estudio de Macbeth y colaboradores realizaron comparaciones entre individuos y no con respecto al mismo individuo. En este sentido, los propios autores señalaron que en varios animales observaron diferencias en la concentración de cortisol entre las muestras de pelo claro y oscuro recolectadas del mismo sujeto. Esto sugería, según sus observaciones, que dicha concentración tendía a ser más alta en el pelo oscuro que en el claro (Macbeth et al., 2010). En cualquier caso, actualmente se desconocen las causas que subyacen a la posible relación entre el color del pelo y las medidas de concentración de esta hormona. Aun así, es importante tenerlo en cuenta, pues podrían producirse sesgos en estudios observacionales del cortisol en los que los rasgos predictores pudieran estar asociados con el color del pelo. De hecho, cabe apuntar a que en varias especies se han descrito diferencias

comportamentales entre individuos en función de la coloración (Cottle and Price, 1987; Podberscek and Serpell, 1996; Ducrest et al., 2008; Kim et al., 2010).

Otro aspecto metodológico que ha generado un amplio debate es la importancia de la selección de la región anatómica. Son muchos los estudios en animales que han revelado diferencias en la concentración de cortisol en pelo en función de la región corporal (Macbeth et al., 2010; Terwissen et al., 2013; Moya et al., 2013; Fourie et al., 2016; Casal et al., 2017). Algunas de las hipótesis que se han propuesto para explicar estas variaciones son las diferentes tasas de crecimiento del pelo, el flujo sanguíneo de esa región anatómica, la diferente exposición a la radiación ultravioleta, la contaminación por heces y el acicalamiento (Heimbürge et al., 2019). En relación con esto último, por ejemplo, en monos Rhesus se suele obtener la muestra de la zona de la nuca precisamente porque no acceden a esta cuando se acicalan (Meyer and Novak, 2012). En nuestro estudio se optó por la región del muslo, con lo cual no se evitó este posible factor de confusión. De todas formas, teniendo en cuenta la investigación generada hasta el momento, parece que, con independencia de la localización anatómica, lo más importante es mantener constante la región de muestreo en todos los sujetos.

En otro orden de ideas, el análisis de la concentración de cortisol y de las características individuales de los animales (tales como la edad y el sexo), así como de la composición del grupo social y de las condiciones de alojamiento, no reflejó una relación significativa. Revisando de forma concreta los resultados obtenidos con relación al sexo y la edad de los animales, nuestros hallazgos son consistentes con los de otros estudios realizados en perros (Bennet and Hayssen, 2010; Roth et al., 2016), en osos grizzly (Macbeth et al., 2010), en lince canadienses (Terwissen et al., 2013) y en orangutanes (Carlitz et al., 2014). También lo son con trabajos que utilizaron otras matrices para el análisis de la concentración de cortisol, como el plasma (Hennessy et al., 1997), la orina (Stephen and Ledger, 2006) y las heces (Ramos et al., 2013). En el caso concreto de un estudio realizado en osos polares no se encontró efecto de la edad, pero, sin embargo, sí se hallaron concentraciones de cortisol en pelo significativamente superiores en hembras que en machos (Bechshøft et al., 2011). En trabajos hechos en humanos en los que se analiza si los niveles de cortisol pueden verse afectados por el sexo existen resultados contradictorios, encontrándose estudios que demuestran este efecto (Dettenborn et al., 2012; Stalder et al., 2017; Binz et al., 2018) y otros que no (Fischer et al., 2017; Wosu et al., 2015). También hay estudios cuyos resultados mostraron que los niveles de cortisol en pelo estaban influenciados por la edad, tanto en personas (Dettenborn et al., 2012; Stalder et al., 2017; Binz et al., 2018) como en otros animales (González-de-la-Vara et al., 2011). En cuanto a la especie felina, nuestros resultados coinciden con estudios como el de Galuppi y colaboradores, en el que evaluaron la concentración de cortisol en pelo en presencia o ausencia de infección por *Microsporium canis* y no

hallaron diferencias significativas en los niveles hormonales con respecto al sexo y la edad de los gatos (Galuppi et al., 2013). En cualquier caso, a pesar de esta inconsistencia, el conjunto de los hallazgos hasta el momento parece indicar que existe una reducción de la concentración de cortisol en pelo dependiente de la edad desde los grupos de edad más jóvenes a los adultos, no encontrándose estas diferencias cuando se comparan grupos de edad juveniles o adultos (Heimbürge et al., 2019).

Por otra parte, cabe señalar que en líneas generales los niveles basales de glucocorticoides parecen ser más altos en las hembras que en los machos en la mayoría de las especies de mamíferos (Handa et al., 1994; Reeder and Kramer, 2005). Asimismo, las hembras parecen tener una respuesta hormonal al estrés mayor (Reeder and Kramer, 2005; Garnier et al., 1990). A este respecto, Ogilvie y Rivier sostienen que los estrógenos activan el eje HPA aumentando la secreción de adrenocorticotropina, mientras que los andrógenos testiculares ejercen una influencia inhibitoria suprimiendo la secreción adrenal de glucocorticoides (Ogilvie and Rivier, 1997).

En definitiva, aunque parece que la concentración de cortisol en pelo podría verse afectada por factores como la edad y el sexo de los individuos, la literatura arroja resultados muy inconsistentes con respecto a este efecto. Posiblemente los estudios que utilicen individuos de diferentes grupos de edad y de sexos en las mismas condiciones experimentales – de manera que se puedan controlar de forma cuidadosa otras variables – sean más útiles para detectar estas diferencias de las características individuales de los animales en la concentración de cortisol en pelo. Con todo, en la investigación sobre los efectos del estrés se recomiendan protocolos de muestreo que estandaricen estos factores de confusión en la medida de lo posible (Heimbürge et al., 2019).

Por otro lado, entrando ya en los aspectos ambientales, en el estudio de Bennett y Hayssen encontraron que los perros que vivían solos tenían un nivel de cortisol basal significativamente menor que los que vivían en hogares con otros congéneres (Bennet and Hayssen, 2010). Por el contrario, Nicholson y Meredith no hallaron diferencias significativas en los niveles de cortisol en pelo entre perros que vivían solos y los que convivían con otros, aunque sí encontraron una correlación positiva entre la concentración de cortisol y el tiempo que los animales permanecían solos en aquellos individuos que no cohabitaban con más perros (Nicholson and Meredith, 2015). En este sentido, cabe destacar que para muchas especies animales el aislamiento es claramente estresante (perros, Hetts et al., 1992; ganado vacuno, Boissy and Neindre, 1997; Bøe and Færevik, 2003; ratas, Weiss et al., 2004; primates, Lewis et al., 2000). De hecho, el alojamiento en grupo se considera un requisito importante para asegurar un buen bienestar en las especies sociales domésticas. Con respecto al gato doméstico, dado su origen, habitualmente se asume que los

individuos de esta especie que han de compartir espacio con otros congéneres experimentan más estrés que los que viven solos. No obstante, gracias a la domesticación el gato parece ser más social y capaz de establecer grupos sociales estables que su antepasado (Macdonald et al., 2000). En este marco, Finka y colaboradores revisaron la evidencia sobre el impacto de las condiciones de alojamiento individuales en comparación con las viviendas con múltiples gatos con relación al estrés y encontraron poca coherencia en la literatura (Finka et al., 2014). Si bien algunos estudios sugerían que las viviendas individuales podían ser menos estresantes para esta especie, otros apuntaban lo contrario. Por otra parte, en un trabajo en el que compararon los niveles de glucocorticoides fecales de gatos alojados de forma individual y otros procedentes de hogares con múltiples individuos, no encontraron diferencias significativas en los niveles hormonales en función del estilo de vida (Ramos et al., 2013). Desde otra perspectiva, Kessler y Turner observaron que la experiencia social previa era un importante factor en los niveles de estrés de los gatos alojados en grupo y que la introducción de individuos no socializados generaba un incremento en dichos niveles de todos los animales (Kessler and Turner, 1999). En nuestro estudio este aspecto no se controló y, de hecho, algunos de los problemas de comportamiento que presentaban los gatos participantes precisamente incluían los conflictos entre congéneres. De nuevo, sería interesante poder llevar a cabo trabajos en esta especie en los que se estandarizaran todos los parámetros ambientales y de manejo para poder analizar el efecto de este aspecto concreto.

Por último, aunque en nuestro estudio no se tuvo en cuenta, es posible que pueda haber también una influencia estacional en los niveles hormonales. Por ejemplo, en un estudio en el que analizaron niveles de cortisol en pelo en perros de raza pastor alemán encontraron una influencia significativa de la estación en estos niveles (Roth et al., 2016). En cualquier caso, aunque parece probable que existan variaciones estacionales, los resultados de los estudios en diferentes especies han arrojado hasta el momento resultados muy inconsistentes (Heimbürge et al., 2019).

4.2. Cortisol en pelo como medida de estrés crónico

La mayor parte de la investigación en el análisis de cortisol en pelo como marcador de estrés crónico es asociativa (Russell et al., 2012). Por citar un caso, Flinkler y Terkel analizaron la relación entre la esterilización, las agresiones y los niveles de cortisol en gatas de colonias y encontraron que las hembras esterilizadas mostraban niveles más bajos de agresión y de cortisol en pelo. Sin embargo, tal y como señalan los autores, se podían considerar explicaciones alternativas para los niveles

reducidos de esta hormona encontrados en las hembras esterilizadas y menos agresivas que no tuvieran que ver necesariamente con una menor presión social y reproductiva (Finkler and Terkel, 2010). Por tanto, este tipo de trabajos no permiten confirmar la causa que provoca el cambio en los niveles de estrés detectados. En este sentido, los estudios que implican una intervención para comprobar si se produce una variación en los niveles de cortisol en el pelo son importantes. Entre otras cosas, podrían proporcionar una mayor comprensión del papel de las intervenciones comportamentales y farmacológicas en la actividad a largo plazo del eje HPA, lo cual podría ayudar en el desarrollo y mejora de las medidas que habitualmente se utilizan. En este aspecto, cabe indicar que la capacidad de esta metodología para monitorear el estrés crónico y detectar variaciones en las concentraciones de cortisol se ha visto reflejada en diversos trabajos. Por ejemplo, tal y como señalan Russell y colaboradores en su revisión (2012), varios estudios han encontrado cambios consistentes durante la presentación de la enfermedad de Cushing según el curso clínico de la enfermedad (Thomson et al., 2010; Manenschijn et al., 2011). Por otra parte, los resultados de un estudio realizado con macacos Rhesus demostraron que las concentraciones de cortisol en pelo eran sensibles a un estresor ambiental prolongado en el tiempo, como fue la reubicación de los sujetos a un nuevo lugar con diferentes condiciones de alojamiento (Davenport et al., 2006). De forma similar, los hallazgos de otro trabajo en conejos sugirieron que el cortisol en pelo se podía utilizar para monitorear la adaptación de los animales a las variaciones ambientales, concretamente la reubicación en otra instalación (Peric et al., 2017).

En nuestro caso, los niveles de cortisol no se redujeron significativamente con las estrategias terapéuticas dirigidas a atenuar el estrés de los animales. Si bien es cierto que se trata de una especie diferente y de la que no se disponen de trabajos de este tipo para poder comparar, también conviene tener en cuenta la gran variabilidad de nuestro estudio en cuanto a las condiciones de vida de los animales, así como los diferentes tipos de factores estresantes que podían afectar los niveles de cortisol. Esta dificultad para estandarizar y controlar los parámetros ambientales y de manejo en los estudios realizados en entornos domésticos puede complicar la interpretación de los resultados. Por otro lado, cabe señalar que existen resultados contradictorios al tratar de vincular el estrés crónico y la función de eje HPA (Miller et al., 2007; Staufenbiel, 2013).

5. CONCLUSIONES

La evaluación del estrés crónico en los gatos que viven en un entorno doméstico supone un desafío, por lo que es fundamental encontrar indicadores válidos. La valoración de los niveles de cortisol en pelo representa un método novedoso y ventajoso a nivel metodológico. No obstante, quedan cuestiones importantes por determinar, sobre todo en cuanto a los factores que pueden tener un efecto en dichos niveles. En nuestro caso, el color del pelo tuvo una influencia significativa, lo cual sugiere que es necesario tenerlo en cuenta al emplear esta metodología.

Por otra parte, no parece que la valoración de los niveles de cortisol en pelo sea un método adecuado para analizar el éxito de las estrategias dirigidas a reducir el estrés en los gatos domésticos.

6. REFERENCIAS

- Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., & Seren, E. (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology*, *155*(2), 398–402. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.07.002
- Amat, M., Camps, T., & Manteca, X. (2016). Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *18*(8), 577–586. doi: 10.1177/1098612x15590867
- Bechshøft, T. Ø., Sonne, C., Dietz, R., Born, E. W., Novak, M. A., Henchey, E., & Meyer, J. S. (2011). Cortisol levels in hair of East Greenland polar bears. *Science of The Total Environment*, *409*(4), 831–834. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.047
- Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, *39*(3), 171–180. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.04.003
- Binz, T. M., Rietschel, L., Streit, F., Hofmann, M., Gehrke, J., Herdener, M., ... Baumgartner, M. R. (2018). Endogenous cortisol in keratinized matrices: Systematic determination of baseline cortisol levels in hair and the influence of sex, age and hair color. *Forensic Science International*, *284*, 33–38. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.12.032

Capítulo 2

- Bøe, K. E., & Færevik, G. (2003). Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *Applied Animal Behaviour Science*, *80*(3), 175–190. doi: 10.1016/s0168-1591(02)00217-4
- Boissy, A., & Le Neindre, P. (1997). Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiology & Behavior*, *61*(5), 693–699. doi: 10.1016/s0031-9384(96)00521-5
- Bradshaw, J. W. (2018). Normal feline behaviour: ... and why problem behaviours develop. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *20*(5), 411–421. doi: 10.1177/1098612x18771203
- Broom, D. M., & Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Bryan, H. M., Adams, A. G., Invik, R. M., Wynne-Edwards, K. E., Smits, J. E. (2013). Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *52*(2), 189–196.
- Buffington, C. A., Westropp, J. L., Chew, D. J., & Bolus, R. R. (2006). Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, *8*(4), 261–268. doi: 10.1016/j.jfms.2006.02.002
- Casal, N., Manteca, X., Peña L, R., Bassols, A., & Fàbrega, E. (2017). Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs. *Journal of Veterinary Behavior*, *19*, 1–6. doi: 10.1016/j.jveb.2017.01.002
- Carlitz, E. H. D., Kirschbaum, C., Stalder, T., & van Schaik, C. P. (2014). Hair as a long-term retrospective cortisol calendar in orang-utans (*Pongo spp.*): New perspectives for stress monitoring in captive management and conservation. *General and Comparative Endocrinology*, *195*, 151–156. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.11.002
- Cottle, C. A., & Price, E. O. (1987). Effects of the nonagouti pelage-color allele on the behavior of captive wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *101*(4), 390–394. doi: 10.1037//0735-7036.101.4.390
- Davenport, M. D., Tiefenbacher, S., Lutz, C. K., Novak, M. A., & Meyer, J. S. (2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology*, *147*(3), 255–261. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.01.005

- Defauw, P. A., Van de Maele, I., Duchateau, L., Polis, I. E., Saunders, J. H., & Daminet, S. (2011). Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *13*(12), 967–975. doi: 10.1016/j.jfms.2011.08.001
- Dettenborn, L., Tietze, A., Kirschbaum, C., & Stalder, T. (2012). The assessment of cortisol in human hair: Associations with sociodemographic variables and potential confounders. *Stress*, *15*(6), 578–588. doi: 10.3109/10253890.2012.654479
- Ducrest, A. L., Keller, L., & Roulin, A. (2008). Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(9), 502–510. doi: 10.1016/j.tree.2008.06.001
- Edney, A. T. B. (1998). Reasons for the euthanasia of dogs and cats. *Veterinary Record*, *143*(4), 114. doi: 10.1136/vr.143.4.114
- Finka, L. R., Ellis, S. L., & Stavisky, J. (2014). A critically appraised topic (CAT) to compare the effects of single and multi-cat housing on physiological and behavioural measures of stress in domestic cats in confined environments. *BMC Veterinary Research*, *10*(1), 73. doi: 10.1186/1746-6148-10-73
- Finkler, H., & Terkel, J. (2010). Cortisol levels and aggression in neutered and intact free-roaming female cats living in urban social groups. *Physiology & Behavior*, *99*(3), 343–347. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.11.014
- Fischer, S., Duncko, R., Hatch, S. L., Papadopoulos, A., Goodwin, L., Frissa, S., ... Cleare, A. J. (2017). Sociodemographic, lifestyle, and psychosocial determinants of hair cortisol in a South London community sample. *Psychoneuroendocrinology*, *76*, 144–153. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.11.011
- Fourie, N. H., Brown, J. L., Jolly, C. J., Phillips-Conroy, J. E., Rogers, J., & Bernstein, R. M. (2016). Sources of variation in hair cortisol in wild and captive non-human primates. *Zoology*, *119*(2), 119–125. doi: 10.1016/j.zool.2016.01.001
- Galuppi, R., Leveque, J. F., Beghelli, V., Bonoli, C., Mattioli, M., Ostanello, F., ... Accorsi, P. (2013). Cortisol levels in cats' hair in presence or absence of *Microsporum canis* infection. *Research in Veterinary Science*, *95*(3), 1076–1080. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.07.023

Capítulo 2

- Gao, W., Xie, Q., Jin, J., Qiao, T., Wang, H., Chen, L., ... Lu, Z. (2010). HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clinical Biochemistry*, 43(7-8), 677–682. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.01.014
- Garnier, F., Benoit, E., Virat, M., Ochoa, R., & Delatour, P. (1990). Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Laboratory Animals*, 24(1), 40–43. doi: 10.1258/002367790780890356
- González-de-la-Vara, Mdel R., Valdez, R. A., Lemus-Ramirez, V., Vázquez-Chagoyán, J. C., Villa-Godoy, A., Romano, M. C. (2011). Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(3), 216–221.
- Habib, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(3), 695–728. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70208-5
- Handa, R. J., Burgess, L. H., Kerr, J. E., & Okeefe, J. A. (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior*, 28(4), 464–476. doi: 10.1006/hbeh.1994.1044
- Heimbürge, S., Kanitz, E., & Otten, W. (2019). The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology*, 270, 10–17. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.09.016
- Hennessy, M. B., Davis, H. N., Williams, M. T., Mellott, C., Douglas, C. W. (1997). Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiology & Behavior*, 62(3), 485–490. doi: 10.1016/s0031-9384(97)80328-9
- Hetts, S., Clark, J. D., Calpin, J. P., Arnold, C. E., & Mateo, J. M. (1992). Influence of housing conditions on beagle behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 34(1-2), 137–155. doi: 10.1016/s0168-1591(05)80063-2
- Kessler, M. R., Turner, D. C. (1999). Socialization and stress in cats (*Felis silvestris catus*) housed singly and in groups in animal shelters. *Animal Welfare*, 8(1), 15–26.

- Kim, Y. K., Lee, S. S., Oh, S. I., Kim, J. S., Suh, E. H., Houpt, K. A., ... Yeon, S. C. (2010). Behavioural reactivity of the Korean native Jindo dog varies with coat colour. *Behavioural Processes*, *84*(2), 568–572. doi: 10.1016/j.beproc.2010.02.012
- Koren, L., Mokady, O., Karaskov, T., Klein, J., Koren, G., & Geffen, E. (2002). A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Animal Behaviour*, *63*(2), 403–406. doi: 10.1006/anbe.2001.1907
- Lewis, M. H., Gluck, J. P., Petitto, J. M., Hensley, L. L., & Ozer, H. (2000). Early social deprivation in nonhuman primates: long-term effects on survival and cell-mediated immunity. *Biological Psychiatry*, *47*(2), 119–126. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00238-3
- Manenschiijn, L., Koper, J. W., Lamberts, S. W., & van Rossum, E. F. (2011). Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids*, *76*(10-11), 1032–1036. doi: 10.1016/j.steroids.2011.04.005
- Macbeth, B. J., Cattet, M. R. L., Stenhouse, G. B., Gibeau, M. L., & Janz, D. M. (2010). Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Canadian Journal of Zoology*, *88*(10), 935–949. doi: 10.1139/z10-057
- Macdonald, D.W., Yamaguchi, N., & Kerby, G. (2000). Group-living in the domestic cat: its socio-biology and epidemiology. In: D. C. Turner, P. Bateson (Ed.), *The domestic cat. The biology of its behaviour* (pp. 95-118). Cambridge: Cambridge University Press.
- McEwen, B.S. (2007). Stress, definitions and concepts of. In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (pp. 653–653). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Meyer, J. S., & Novak, M. A. (2012). Minireview: hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*, *153*(9), 4120–4127. doi: 10.1210/en.2012-1226
- Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological Bulletin*, *133*(1), 25–45. doi: 10.1037/0033-2909.133.1.25

Capítulo 2

- Moya, D., Schwartzkopf-Genswein, K. S., & Veira, D. M. (2013). Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. *Livestock Science*, *158*(1-3), 138–144. doi: 10.1016/j.livsci.2013.10.007
- Nicholson, S. L., & Meredith, J. E. (2015). Should stress management be part of the clinical care provided to chronically ill dogs? *Journal of Veterinary Behavior*, *10*(6), 489–495. doi: 10.1016/j.jveb.2015.09.002
- Ogilvie, K. M., & Rivier, C. (1997). Gender difference in hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to alcohol in the rat: activational role of gonadal steroids. *Brain Research*, *766*(1-2), 19–28. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00525-8
- Peric, T., Comin, A., Corazzin, M., Montillo, M., Canavese, F., Stebel, M., & Prandi, A. (2017). Relocation and hair cortisol concentrations in New Zealand white rabbits. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *20*(1), 1–8. doi: 10.1080/10888705.2016.1183489
- Podberscek, A. L., & Serpell, J. A. (1996). The English Cocker Spaniel: preliminary findings on aggressive behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, *47*(1-2), 75–89. doi: 10.1016/0168-1591(95)01012-2
- Ramos, D., Reche-Junior, A., Fragoso, P., Palme, R., Yanasse, N., Gouvêa, V., ... Mills, D. (2013). Are cats (*Felis catus*) from multi-cat households more stressed? Evidence from assessment of fecal glucocorticoid metabolite analysis. *Physiology & Behavior*, *122*, 72–75. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.08.028
- Reeder, D. M., & Kramer, K. M. (2005). Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy*, *86*(2), 225–235. doi: 10.1644/bhe-003.1
- Rippe, R. C., Noppe, G., Windhorst, D. A., Tiemeier, H., van Rossum, E. F., Jaddoe, V. W., ... van den Akker, E. L. (2016). Splitting hair for cortisol? Associations of socio-economic status, ethnicity, hair color, gender and other child characteristics with hair cortisol and cortisone. *Psychoneuroendocrinology*, *66*, 56–64. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.016
- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*(2), 89–95.

- Roth, L. S., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, *6*(1), 19631. doi: 10.1038/srep19631
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589–601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
- Salman, M. D., Hutchison, J., Ruch-Gallie, R., Kogan, L., New, J. C., Kass, P. H., & Scarlett, J. M. (2000). Behavioral reasons for relinquishment of dogs and cats to 12 shelters. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *3*(2), 93–106. doi: 10.1207/s15327604jaws0302_2
- Sauvé, B., Koren, G., Walsh, G., Tokmakejian, S., & van Uum, S. H. (2007). Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clinical & Investigative Medicine*, *30*(5), E183-E191. doi: 10.25011/cim.v30i5.2894
- Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W., Spijker, A. T., Elzinga, B. M., & van Rossum, E. F. (2013). Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(8), 1220–1235. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.11.015
- Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W., de Rijke, Y. B., van den Akker, E. L., & van Rossum, E. F. (2015). Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology*, *60*, 182–194. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.06.011
- Stephen, J. M., & Ledger, R. A. (2006). A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Physiology & Behavior*, *87*(5), 911–916. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.02.015
- Stalder, T., Steudte-Schmiedgen, S., Alexander, N., Klucken, T., Vater, A., Wichmann, S., Kirschbaum, C., & Miller, R. (2017). Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 261–274. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.12.017
- Talló, O. (2016). *Hair cortisol in cattle as a measure of long-term adrenal activity* (PhD Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Talló-Parra, O., Manteca, X., Sabes-Alsina, M., Carbajal, A., & Lopez-Bejar, M. (2015). Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal*, *9*(6), 1059–1064. doi: 10.1017/s1751731115000294

Capítulo 2

- Tanaka, A., Wagner, D. C., Kass, P. H., & Hurley, K. F. (2012). Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 240*(5), 570–576. doi: 10.2460/javma.240.5.570
- Terwissen, C. V., Mastromonaco, G. F., & Murray, D. L. (2013). Influence of adrenocorticotrophin hormone challenge and external factors (age, sex, and body region) on hair cortisol concentration in Canada lynx (*Lynx canadensis*). *General and Comparative Endocrinology, 194*, 162–167. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.09.010
- Thomson, S., Koren, G., Fraser, L. A., Rieder, M., Friedman, T. C., & van Uum, S. H. (2010). Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 118*(02), 133–138. doi: 10.1055/s-0029-1220771
- Virga, V. (2003). Behavioral dermatology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 33*(2), 231–251. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00102-x
- Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research, 152*(2), 279–295. doi: 10.1016/j.bbr.2003.10.015
- Westropp, J. L., & Buffington, C. A. (2004). Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 34*(4), 1043–1055. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.03.002
- Wosu, A. C., Gelaye, B., Valdimarsdóttir, U., Kirschbaum, C., Stalder, T., Shields, A. E., & Williams, M. A. (2015). Hair cortisol in relation to sociodemographic and lifestyle characteristics in a multiethnic US sample. *Annals of Epidemiology, 25*(2), 90-95.e952 doi: 10.1016/j.annepidem.2014.11.022
- Yamanashi, Y., Morimura, N., Mori, Y., Hayashi, M., & Suzuki, J. (2013). Cortisol analysis of hair of captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *General and Comparative Endocrinology, 194*, 55–63. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.08.013

CAPÍTULO 3

Necesidad de generar un marco conceptual preciso y sin sesgos en el campo del comportamiento animal

1. INTRODUCCIÓN

El antropomorfismo puede definirse como la atribución de cualidades humanas a entidades no humanas, generalmente sin una justificación sólida detrás (Shettleworth, 2010b). Esta asignación se hace extensiva a múltiples características, desde las de tipo más físico a cuestiones de carácter moral y de personalidad (Keeley, 2004). En el contexto del comportamiento animal hace referencia a la adscripción de experiencias mentales o rasgos psicológicos humanos a otros organismos (Kennedy, 1992). En este aspecto, cabe señalar que se trata de una práctica totalmente generalizada (Caporael and Heyes, 1997; Urquiza-Haas, 2015) y natural en las personas (Serpell, 2003; Wynne, 2007b). De hecho, esta capacidad de atribuir estados mentales a uno mismo y a otros se considera fundamental para la vida social humana (Heyes, 2015). En efecto, ha llegado un punto en el que incluso se otorga a la introspección la facultad de proporcionar información fiable sobre la conexión entre estados mentales determinados y comportamientos (Povinelli et al., 2000). El problema aparece cuando esta tendencia tan arraigada en los seres humanos traspasa las fronteras de lo cotidiano y se traslada a ámbitos en los que su presencia es cuestionable.

2. ANTROPOMORFISMO EN LA CIENCIA COGNITIVA

2.1. Renacimiento del antropomorfismo en la ciencia y situación del debate actual

En los últimos tiempos ha prevalecido en el estudio del comportamiento animal – y en especial en el contexto de la investigación cognitiva – un enfoque antropocéntrico en el que la pregunta ha estado centrada en comprobar si los animales pueden hacer lo que hacen las personas. Es decir, un enfoque centrado en la psicología humana. La investigación basada en esta visión se focaliza en tipos de procesamiento cognitivo que pueden identificarse en los humanos y trata de compararlo con otras especies cuya elección a menudo se basa más en la conveniencia que en consideraciones evolutivas (Shettleworth, 2010a). Pero es que además en ocasiones este enfoque se vuelve también antropomórfico al partir de nuestras propias experiencias subjetivas para analizar el comportamiento animal en base a sus respuestas conductuales. De esta forma, se les atribuyen experiencias similares y se acaba explicando su desempeño en diferentes tareas en términos de pensamiento de tipo humano. No obstante, el hecho de que esta tendencia antropomórfica sea una práctica universal – siendo incluso definida por algunos autores como una cognición por defecto

(Caporael and Heyes, 1997) – no significa que científicamente sea correcto. A pesar de ello, hay quien sugiere que la aplicación de estos conceptos enriquece el rango de hipótesis a considerar (Buckner, 2013). Incluso ha habido también algunos intentos de darle una orientación científica utilizando términos como antropomorfismo crítico (Burghardt, 2007) o antropomorfismo centrado en el animal (De Waal, 1997). Por su parte, Keeley reconoce que la mayor complicación del antropomorfismo es la de interpretar la información sin hacer atribuciones incorrectas (Keeley, 2004). Y en el otro extremo encontramos varias las voces que llevan años señalando la naturaleza intrínsecamente antropomórfica del lenguaje cotidiano – utilizado con frecuencia en ciertas áreas científicas –, así como del propio pensamiento científico (Kennedy, 1992) y remarcando la importancia de inhibir esta tendencia tan nuestra para que las ciencias del comportamiento y de la cognición de los animales puedan crecer (Wynne, 2007a). A lo largo de esta sección vamos a desgranar con más detalle esta problemática, así como las propuestas de diferentes investigadores para evitar perpetuarla.

En los últimos años ha habido un importante desarrollo de los estudios sobre la cognición animal y la balanza se ha decantado claramente en la búsqueda de semejanzas entre especies, más que de las diferencias (Povinelli et al., 2000). Especialmente llamativo ha sido el auge de los estudios experimentales que pretenden demostrar la existencia de procesos metacognitivos en animales no humanos, entendiendo la metacognición como la capacidad de pensar sobre los estados cognitivos de uno mismo (Carruthers, 2008). Povinelli y colaboradores consideran que la capacidad de mentalización diferencia al humano del resto de animales. De esta manera, aunque otras especies posean estados mentales, solo los humanos habrían desarrollado una especialización cognitiva para razonar sobre tales estados (Povinelli et al., 2000). De modo similar, otros investigadores directamente conciben la autoconsciencia como una experiencia exclusivamente humana (Tulving, 2005; Werning, 2010; Lewis, 2014). Sin embargo, acogiéndose a la visión darwiniana, el hecho de afirmar que únicamente las personas poseen ese tipo de consciencia parece rechazar la continuidad evolutiva. En este sentido, el antropomorfismo actual estaría totalmente influenciado por las ideas de Darwin sobre la psicología animal (Shettleworth, 2010b; Wynne 2007b). No obstante, en palabras de Penn y colaboradores: “la profunda continuidad biológica entre las especies enmascara una discontinuidad igualmente profunda entre las mentes humanas y no humanas... y dicha discontinuidad funcional impregnaría casi todos los dominios de la cognición” (Penn, Holyoak and Povinelli, 2008). En relación con esto, los estudios a nivel cerebral revelan diferencias significativas a nivel estructural y de conectividad con respecto al resto de los animales. Estas particularidades del cerebro humano – relacionadas, a su vez, con la aparente singularidad cognitiva de nuestra especie – se han abordado desde diferentes niveles de análisis (Somel et al., 2013; He et al., 2017; Sousa et al.,

2017; Hardingham et al., 2018). Por ejemplo, los estudios de neuroanatomía comparativa de la corteza prefrontal – región fundamental para el funcionamiento ejecutivo y social normal – entre humanos y otras especies de primates estrechamente relacionadas proporcionan información sobre la evolución más reciente (Preuss, 2011). Concretamente, se han hallado propiedades diferenciales a nivel de las espinas dendríticas, tanto en número como en densidad (Elston et al., 2001). También se ha encontrado esta divergencia a nivel molecular, incluidos los patrones de expresión génica diferenciales (Cáceres et al., 2003; Preuss et al., 2004), que incluso han llegado a plantear unas diferencias genéticas entre humanos y chimpancés mayores de lo que se pensaba anteriormente (Preuss, 2012). Asimismo, se han observado diferencias de tamaño absoluto, microestructurales y de organización (Teffer and Semenderefi, 2012). En este último artículo citado, las investigadoras sugieren que estas modificaciones pueden haber predisuesto a los humanos a una serie de trastornos neurológicos y psicológicos como el autismo y la esquizofrenia. Por tanto, aunque no cabe duda de que el cerebro humano ha pasado por los mismos procesos graduales que el resto de las especies, es también una estructura singular. Relacionado con esto, Premack señala la curiosa disparidad que existe al revisar estos hallazgos a nivel cerebral con respecto a los de los estudios sobre cognición animal (Premack, 2007), puesto que continuamente se están reportando habilidades cognitivas en animales que se creían exclusivas de las personas.

Adicionalmente, este tipo de explicaciones basadas en lo que se conoce como psicología popular son fáciles de generar, de comprender e incluso de trasladar a la hora de comunicar un mensaje que, además, resulta más atractivo e intuitivo para los receptores (Heyes, 2012). En este marco, Shettleworth subraya la idea de que en los estudios sobre cognición animal parece que es más fuerte la tendencia de demostrar comportamientos complejos parecidos a los humanos (*human-like behaviors*) – que surgen de procesos como la teoría de la mente – en lugar de mecanismos más simples (Shettleworth, 2010b). Resulta curiosa dicha tendencia cuando mucho de lo que el nuestro cerebro hace, lo logra a través de procesos simples e inconscientes (LeDoux, 2015). Por tanto, la utilización de este tipo de concepciones que atribuyen ciertos mecanismos hipotéticos a los animales puede responder a un antropomorfismo injustificado que ni siquiera resulta útil en ocasiones para explicar el comportamiento humano (Shettleworth, 2010a). En este aspecto, gran parte de lo que las personas hacen en su día a día se produce sin una consciencia explícita y a través del procesamiento automático de la información (LeDoux, 2019).

Con todo, cabe señalar que muchos investigadores optan por permanecer agnósticos en cuanto a la cuestión sobre si los animales procesan la información conscientemente o no (Sober, 2005; Shettleworth, 2010a; LeDoux, 2019; Brown et al., 2019). De hecho, Cecilia Heyes – una de las

investigadoras más críticas – no niega tajantemente que los animales experimenten estados de consciencia fenoménica, simplemente apunta a que de momento no han sido testados utilizando los métodos científicos adecuados como para afirmarlo (Heyes, 2008; Heyes, 2015). Como señala LeDoux, no se trata de descartar la consciencia de los animales, sino de ser más cuidadoso al hacer afirmaciones científicas al respecto. Es decir, se trataría de exigir estándares científicos más rigurosos que permitieran considerar si el comportamiento bajo estudio se explica mejor como dependiente de la consciencia y no puede explicarse razonablemente en términos de algún proceso no consciente (LeDoux, 2019).

2.2. Problemas asociados al razonamiento analógico y al registro anecdótico

Un claro ejemplo de la inferencia de procesos cognitivos desde una visión antropomórfica es el utilizar el razonamiento analógico como enfoque metodológico. Dicho razonamiento está basado en la argumentación de que si el comportamiento de un animal se parece al que haría un humano en una situación similar, entonces se puede explicar de la misma manera. Un ejemplo clásico de razonamiento analógico es el que se utiliza en la prueba del espejo. Esta prueba se basa en provocar algún cambio en la apariencia del individuo, de manera que si este da muestras de localizar dicho cambio se supone que es indicativo de que reconoce su propia apariencia en el reflejo del espejo. En el caso de los animales no humanos se da por hecho que el autorreconocimiento en el espejo es muestra de un pensamiento consciente de orden superior. Esto es, si el animal utiliza su imagen en el espejo entenderá que esa imagen representa la suya, al igual que ocurriría con una persona en ese mismo contexto (Heyes, 2008). Encontramos diferentes especies que han pasado esta prueba, como los chimpancés, los delfines y los elefantes, entre otros (Gallup, 1970; Reiss and Marino, 2001; Plotnik et al., 2006). Incluso recientemente un estudio que utilizó una versión de este paradigma en peces, siguiendo criterios parecidos a trabajos realizados en otras especies, mostró resultados que podrían interpretarse como que los sujetos pasaban esta prueba. Los propios autores plantean la reflexión con respecto a si estos patrones de comportamiento podrían estar basados en procesos cognitivos que no supongan que los animales sean conscientes de sí mismos (Kohda et al., 2019). Tal y como se detallará más adelante, es importante tener siempre presente la posibilidad de explicaciones alternativas que impliquen procesos cognitivos diferentes a los que por defecto parecemos otorgar a los organismos que se comportan de manera similar a nosotros en situaciones parecidas. Y más todavía cuando, como subrayábamos previamente, se sabe que gran parte del comportamiento humano está controlado por mecanismos cognitivos inconscientes. De todas formas, cabe señalar que

Gallup ya reivindicaba años atrás la importancia de no relajar los criterios, pues, según su opinión, muchos de los reclamos de autorreconocimiento en otras especies no cumplían de forma rigurosa el procedimiento de estas pruebas (Gallup, 1994). En cualquier caso, en este tiempo han surgido diferentes voces críticas con esta prueba como medio para demostrar la autoconsciencia, aportando distintas opciones en cuanto a los mecanismos que podrían estar implicados en las respuestas conductuales observadas (Heyes, 1994 & 1995; Povinelli, 1998; Suddendorf, 2013 & 2014).

Los registros anecdóticos también se han utilizado con frecuencia para inferir procesos cognitivos similares a los de los humanos a partir del comportamiento aparentemente semejante. De hecho, algunos investigadores abogan por tener en consideración la opinión de profesionales que interaccionan de forma regular con especies concretas, como cuidadores, entrenadores o granjeros, entre otros (Andrews, 2015). Sin embargo, conviene no olvidar que en todos ellos puede participar un componente de juicio personal en las valoraciones sobre las conductas observadas. En esta línea argumentativa, Suddendorf y Corballis (2009) hacen referencia a un caso relativamente reciente de registro anecdótico que sugería que un chimpancé podría haber planeado con varias horas de antelación la recolección de piedras para poder arrojárse las a los espectadores. El autor de ese artículo (Osvath, 2009), que generó un gran interés internacional, entrevistó a varios cuidadores del zoológico que habían observado al animal aparentemente planeando este comportamiento. En base a esto, el autor argumentó que parecía demostrarse la anticipación de necesidades futuras por parte del chimpancé. No obstante, como señalan Suddendorf y Corballis, el reporte de observaciones pasadas por sí solo no puede en ningún caso establecer de forma concluyente tales capacidades de previsión (Suddendorf and Corballis, 2009). Además, debe tenerse en cuenta que este tipo de registros anecdóticos a menudo se centran en un único individuo cuya historia previa raramente conocemos, cuando las experiencias y los historiales de reforzamiento anteriores suelen ser importantes para explicar los comportamientos de interés. En definitiva, desde el mítico ejemplo del caballo Clever Hans (Pfungst, 1965), ya quedó claro que la simple evidencia anecdótica sobre el comportamiento animal es insuficiente para determinar las capacidades del individuo en cuestión. De hecho, el efecto “Clever Hans” se refiere actualmente a la posibilidad de que el observador influya involuntariamente en los sujetos para producir el comportamiento deseado. Resulta fundamental que dichas contingencias relevantes sean detectadas por los propios investigadores, pues, en caso contrario, pueden ser complicadas de localizar por otros en los artículos ya publicados (Shettleworth, 2010a). En relación con esto, en un estudio reciente sobre la cognición numérica en elefantes encontramos también un ejemplo en el que se evidenció la importancia de las señales visuales. En este trabajo (Irie-Sugimoto and Hasegawa, 2012) los autores acabaron concluyendo que la capacidad

de procesamiento de información de estos animales era cualitativamente diferente a la del resto de especies no humanas. Cuando Perdue y colaboradores lo replicaron utilizando un protocolo más estricto que incluía, entre otras cuestiones, un mejor control de las señales visuales (Perdue et al., 2012), encontraron un rendimiento de los elefantes muy diferente al reportado en el estudio anterior, lo cual llevaba a una conclusión mucho más parsimoniosa.

2.3. El *boom* de la cognición animal y las posibles limitaciones de los estudios

Desde principios del siglo XXI ha habido un incremento significativo de investigaciones que sugieren que los animales tienen intenciones conscientes, creencias, autoconsciencia y una teoría de la mente, además de otras habilidades típicamente humanas como memoria episódica (Clayton, 2001; Crystal, 2009), enseñanza (Boesch, 1991; Thornton and McAuliffe, 2006), planificación (Raby et al., 2007; Raby and Clayton, 2009; Bourjade et al., 2012) o capacidades lingüísticas (Kastak and Schuterman, 2002; Kaminski et al., 2004; Arnold and Zuberbühler, 2006). En psicología, tener una teoría de la mente o capacidad de mentalización significa comprender que otros individuos tienen mentes, es decir, que pueden tener conocimiento, creencias, deseos, etc. (Shettleworth, 2009). La mentalización (Call and Tomasello, 2008) se hace evidente en el engaño intencional (Whiten and Byrne, 1988), la imitación (Whiten et al., 2004), el autorreconocimiento (Povinelli, 1987; Plotnik et al., 2006), la comunicación intencional (Leavens and Hopkins, 1998) o la empatía (Langford et al., 2006; Bartal et al., 2011; Silva and Sousa, 2011; Custance and Mayer, 2012), entre otros. Sin embargo, cabe decir que la investigación sobre la teoría de la mente en animales no humanos ha sido muy controvertida (Shettleworth, 2010a). En este sentido, son numerosos los investigadores que se muestran escépticos – incluso habiendo sido tiempo atrás importantes defensores (Penn y Povinelli, 2007, 2013) – y que señalan que los estudios que sugieren que la teoría de la mente puede ser demostrada en otros animales no son concluyentes. Entre otros motivos, como consecuencia de diversas cuestiones no tenidas en cuenta en los protocolos experimentales habitualmente utilizados que impiden distinguir la lectura mental de otros mecanismos (Lurz, 2011; Whiten, 2013; Heyes, 2015). Para un análisis exhaustivo de gran parte de estos comportamientos supuestamente relacionados con la capacidad de mentalización en diferentes especies, así como la exposición de algunas de las limitaciones de tales afirmaciones, revisar Premack, 2007; Penn, Holyoak and Povinelli, 2008 y Shettleworth, 2010a. En cualquier caso, un ejemplo clarividente de esta problemática viene de un artículo de opinión en el que se abordó la cuestión sobre qué debe constituir evidencia de empatía (Vasconcelos et al., 2012). En dicho artículo ofrecieron una comparación crítica de dos estudios que reportaron fenómenos

similares, pero cuyos autores interpretaron de manera muy diferente. Pese a que los patrones de comportamiento que se observaron en los individuos de ambos estudios – hormigas en uno y ratas en el otro – fueron muy parecidos, las interpretaciones difirieron en gran medida. Tal como señalan Vasconcelos y colaboradores (2012), el comportamiento prosocial representa un fenómeno generalizado y sin controversia. No obstante, la evidencia de empatía requiere mostrar que es el estado afectivo del otro el que actúa como factor causal y que el agente motivado empáticamente comprende dicho estado. En palabras de los investigadores, estos enfoques contrastantes ejemplifican los diferentes estándares en la interpretación de la evidencia dentro de la investigación de la cognición comparativa.

En el caso concreto de los perros, esta especie juega un papel importante en nuestra sociedad y como consecuencia de esta integración también ha habido un incremento significativo de los estudios centrados en comprender sus habilidades cognitivas (Bensky et al., 2013). Buena parte de esta investigación se ha centrado en la cognición social de estos animales, destacando aquellos estudios que ponen a prueba su habilidad en tareas que requieren el uso de estímulos humanos. A menudo en estos procedimientos la toma de perspectiva se define como una capacidad cognitiva que inherentemente requiere de capacidad de mentalización (Roberts and Macpherson, 2011). Sin embargo, varios investigadores del campo instan por revisar la terminología, cuestionando la funcionalidad de describir el comportamiento social canino en términos de teoría de la mente (Roberts and Macpherson, 2011; Udell et al., 2011) y además aportan una serie de hipótesis alternativas posiblemente menos atractivas por ser aparentemente más simples (Udell et al., 2010).

La cuestión es que hoy por hoy no existe una definición clara de lo que es tener una teoría de la mente. En consecuencia, puede haber una libertad considerable a la hora de definir la lectura mental de los animales en investigación, además de no quedar claro lo que se está buscando. Esto, sin duda, genera problemas metodológicos – si no sabes lo que estás buscando, tampoco sabes cómo encontrarlo – y puede ir en detrimento del progreso empírico. Un marco conceptual más claro proporcionaría los cimientos adecuados para la formulación de hipótesis objetivo y alternativas (Heyes, 2015). Si no, se corre el riesgo de llegar a conclusiones falsas positivas. Premack, por su parte, plantea un cambio de enfoque para evitar confundir la similitud en los comportamientos con la equivalencia (Premack, 2007). Por otro lado, algunos investigadores proponen poner el énfasis en los componentes básicos constituyentes que podrían compartirse en una amplia gama de especies, adoptando un enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up perspective*) (de Waal and Ferrari, 2010). Curiosamente, tal y como señala Heyes, este artículo no menciona el aprendizaje asociativo, cuando se trata de una explicación candidata para el comportamiento de una amplia variedad de especies (Heyes, 2012). Con todo, este

punto de vista podría ser más productivo para la investigación y posiblemente el más consistente a la hora de vincular los hallazgos con la perspectiva evolutiva. En relación con esto, conviene tener cautela al utilizar términos excesivamente generales, pues pueden inducir a error generando la entelequia de que pruebas completamente dispares pueden proporcionar evidencia convergente para un único proceso, cuando en realidad son varios los mecanismos subyacentes (Sutton and Shettleworth, 2008). En este sentido, Shettleworth propone evitar preguntarnos si los animales poseen una capacidad determinada – característicamente humana – y cambiar dicha formulación de la siguiente manera: en primer lugar, deconstruir esa habilidad amplia que se pretende estudiar en sus mecanismos o componentes elementales y, a continuación, plantear qué especies muestran dichos componentes (Shettleworth, 2010a). Algunos de estos elementos estarán extendidos filogenéticamente hablando, otros más bien estarán limitados a especies con ecologías específicas o historias evolutivas comunes y puede que algunos sean exclusivos de los humanos (Shettleworth, 2010b). La investigadora expone que un ejemplo claro del éxito de este planteamiento lo constituye el estudio de la evolución del lenguaje. En este ámbito, la clásica pregunta sobre si los animales pueden aprender el lenguaje se reemplazó por el estudio de los componentes compartidos, como el desarrollo de habilidades conceptuales en los primates y el control neuronal y del desarrollo del aprendizaje vocal de los pájaros cantores (Shettleworth, 2010b). En el caso de la imitación encontramos otro ejemplo de la importancia de definir de forma específica lo que se quiere estudiar y de la dificultad de analizar el amplio rango de resultados comportamentales que pueden abarcar fenómenos complejos. Tal y como señalan Cook y colaboradores (Cook et al., 2014), una vez los estudios se empezaron a guiar por una definición más clara y precisa y se centraron en buscar requisitos previos para el comportamiento imitativo, muchos han encontrado evidencia clara de ello (Voelkl and Huber, 2000; Richards et al., 2009; Range et al., 2011).

2.4. La importancia de generar hipótesis alternativas

El apoyo de las explicaciones antropomórficas del comportamiento animal se basa en ocasiones en una comprensión limitada de las alternativas disponibles desde disciplinas como la psicología o la etología (Shettleworth, 2010b). Tal como se ha sugerido en apartados anteriores, es importante tener presente que la similitud funcional entre el comportamiento de dos especies no es necesariamente una evidencia decisiva de un proceso subyacente común (Shettleworth, 2010a). Aun así, parece que la tendencia actual consiste en apoyar las interpretaciones antropomórficas en lugar de enfrentarlas experimentalmente a alternativas bien definidas (Shettleworth, 2010b). Esto se debe, entre otros

motivos, a que esta perspectiva puede conllevar el empleo de métodos más exigentes que produzcan menos resultados positivos, lo cual no parece *a priori* un gran incentivo (Heyes, 2015). En cualquier caso, resulta sorprendente que el enfoque empírico basado en métodos experimentales que contrastan varias explicaciones alternativas – tan generalizado en la investigación científica – se adopte raramente en este campo (Heyes, 2008). Teóricos del aprendizaje como Heyes sostienen que la falta de consenso con relación a si un animal puede atribuir estados mentales se debe a problemas teóricos y a una reducción de los estándares metodológicos (Heyes, 2015). En relación con esto, la investigadora señala la necesidad de generar un conjunto claro de hipótesis alternativas a la lectura mental y el retorno al uso de métodos empíricos exigentes. De forma más concreta, Shettleworth reivindica que para la elaboración de hipótesis alternativas se requieren definiciones funcionales claras y un conocimiento general del aprendizaje y del comportamiento animal. Esto incluye conocer las predisposiciones típicas de la especie, la historia pasada, las claves presentes y otras variables contextuales (Shettleworth, 2010a, 2010b). Además, el estudio del aprendizaje asociativo juega un papel importante en la comprensión de la cognición animal (Dickinson, 2012). Pero más allá de la teoría contemporánea del aprendizaje asociativo (Dickinson, 1980) – en la que nos centraremos por ser de especial relevancia –, otras áreas de la psicología y de la ciencia cognitiva relacionadas con la percepción, la atención, la memoria y el aprendizaje, ofrecen también alternativas a las hipótesis de lectura mental (Heyes, 2015). Aunque se aleja del propósito de este capítulo revisar cada uno de estos aspectos, conviene recordar que el objetivo de la investigación debería ser el de comprender los mecanismos cognitivos que subyacen al comportamiento animal, no reducirlo a tratar de discriminar únicamente los procesos asociativos de los no asociativos (Papineau and Heyes, 2006).

A pesar de que la investigación sobre el aprendizaje asociativo representa una fuente potencial de hipótesis alternativas, plantearlo no supone una perspectiva atractiva para la mayoría de los investigadores. Básicamente porque se trata de una temática altamente técnica, complicada de utilizar y que puede implicar un mayor trabajo empírico (Heyes, 2012). Así pues, paradójicamente en este caso la explicación más simple es precisamente la antropomórfica, pues es la que resulta más sencilla de imaginar o de entender para nosotros (Heyes, 1998). Al mismo tiempo, este tipo de explicaciones no llaman tanto la atención – pues se basan en principios que ya están bien establecidos – ni facilitan el interés por las revistas de alto impacto (Heyes, 2015; Dawkins, 2017). Sin embargo, hay tener presente que el aprendizaje asociativo es ubicuo, se encuentra en múltiples contextos funcionales – desde la evitación de depredadores, al forrajeo, la navegación y determinados aspectos del comportamiento territorial y sexual, entre otros (Heyes, 2012) – y puede explicar gran parte de los fenómenos de aprendizaje observados en una gama amplísima de especies, incluidos los humanos

(Macphail, 1982; Papini, 2008). Además, como señala Heyes, todo lo relacionado con el aprendizaje asociativo es justamente un buen ejemplo de investigación psicológica rigurosa cuyas construcciones teóricas se han ido perfeccionando con el tiempo a través de una extensa investigación experimental sólida, evitando la llamada psicología popular o psicología del sentido común (Heyes, 2015).

Por otra parte, debe aclararse que tampoco hay que acogerse al simplismo de sugerir que la única alternativa a la teoría de la mente son las explicaciones asociativas. Es decir, no estamos hablando de meros seres autómatas que responden a estímulos. De hecho, precisamente la complejidad del comportamiento de los animales es la que puede llevar con cierta facilidad a utilizar términos propios de la conducta humana y hacer atribuciones que realmente no estarían justificadas (Wynne, 2004). De igual modo, tampoco conviene instalarse en la posición contraria y descartar sistemáticamente las explicaciones asociativas por razones históricas, ya que en ocasiones el aprendizaje asociativo parece estar envuelto de un halo peyorativo. Se hace necesario señalar que este tipo de aprendizaje no está representado simplemente por los principios conductistas (Heyes, 2012).

En definitiva, la cognición animal es un campo complejo que arrastra varios problemas desde hace tiempo. Por un lado, la demanda generalmente no cometida de tener un criterio comportamental inequívoco cuando se analiza un proceso cognitivo esencialmente humano en otra especie. Y, por otro lado, los estándares metodológicos disminuidos, la sobreinterpretación de los resultados y las deficiencias de las anécdotas y los estudios de un solo sujeto, entre otras cuestiones (Shettleworth, 2010a; Heyes, 2015). En investigación humana los criterios empleados para discriminar los procesamientos conscientes de los no conscientes son cada vez más estrictos, sin embargo, en la investigación animal es muy complicado obtener esta evidencia (Brown et al., 2019). En cualquier caso, a pesar de los desafíos que enfrenta la investigación científica sobre la consciencia, hoy día es un área de la ciencia próspera (LeDoux, 2017) y son muchos los investigadores que están haciendo esfuerzos importantes para robustecer su legitimidad (Michel et al., 2019).

Por último, conviene señalar que el debate actual en ningún caso debe caer en lo que denominan la antroponegación, negando las similitudes que obviamente existen entre el ser humano y los demás animales, ni mucho menos caminar en contra del bienestar de estos. El problema es que actualmente el acento está puesto en enfatizar el aspecto humano en los animales. Hemos estado mirando el cerebro desde un punto de vista totalmente centrado en nosotros, aun siendo claramente diferentes. Pero como lo son el resto de las especies. En palabras del propio LeDoux “debemos protegernos tanto de las tendencias antropocéntricas como de las antropomórficas, pues a veces atribuimos demasiado a otros animales y en otras ocasiones a nosotros mismos” (LeDoux, 2019).

3. ANTROPOMORFISMO EN LA CIENCIA DE LAS EMOCIONES

El objetivo del apartado anterior ha consistido en analizar desde una visión amplia en distintas áreas de la cognición comparativa los problemas comunes relacionados con las conjeturas especulativas y con el uso del comportamiento para atribuir estados mentales conscientes. Lógicamente este debate también se ha trasladado a la ciencia de las emociones (LeDoux, 2012). En este campo tradicionalmente se han aceptado términos mentalistas antropomorfos para referirse a procesos subyacentes del comportamiento animal, como, por ejemplo, el miedo (Shettleworth, 2010a). En efecto, no es raro encontrar publicaciones que describen comportamientos relacionados con la ansiedad y con el miedo en diferentes especies (Bolles and Fanselow, 1980; Forkman et al., 2007; Rooney et al., 2009; Blackwell et al., 2013).

La tradición antropomórfica se remonta al menos a Darwin, quien arguyó que hemos heredado de los mamíferos los estados mentales correspondientes a las emociones. Además, asumía que el comportamiento observable era un reflejo de lo que el individuo sentía, tanto humanos como otros animales (Darwin, 1872). Es más, el propio Darwin afirmaba lo siguiente: “Creo que no cabe duda de que un perro siente vergüenza” (Darwin, 1871). De forma similar, su discípulo George John Romanes llegó a expresar que los peces pueden estar celosos o enfadados, las aves sentir terror y las hormigas mostrar gran crueldad (Romanes, 1882). En consecuencia, la investigación de la ciencia de las emociones se ha visto afectada considerablemente por las ideas psicológicas de Darwin marcadas por un fuerte antropomorfismo (LeDoux, 2019). Pero el enfoque darwiniano sobre comportamiento animal está desactualizado (Wynne, 2007b). Incluso hay quien señala que esta esta visión de la continuidad biológica ha generado un marco teórico encorsetado – aunque intuitivamente atractivo – que ha mantenido a los investigadores rehenes de dichas constricciones (Povinelli et al., 2000). Por tanto, de nuevo, no disponer de un marco conceptual claro puede generar confusión y esto se ilustra de forma evidente en el caso de las emociones (LeDoux and Hofmann, 2018). De hecho, hay autores que advierten de que las emociones no se han estado buscando de forma correcta en el cerebro (LeDoux, 2019) y en la misma línea argumental se sugiere que los investigadores de la emoción rara vez estudian la emoción en sí misma (Lieberman, 2019).

Joseph LeDoux – artífice de este debate a nivel de la ciencia afectiva en los últimos años – se centra en el miedo, ya que dispone de distintos significados científicos según los diferentes investigadores y ejemplifica bien esta problemática. En este sentido, el miedo en ocasiones se trata como un sentimiento consciente basado en el circuito de la amígdala, pero también con frecuencia es visto

como un estado fisiológico que media entre las amenazas y las respuestas. Otras veces se utiliza este término exclusivamente para referirse a las respuestas conductuales y fisiológicas y en los últimos años algunos investigadores – entre los que se encuentra el propio LeDoux – hablan del miedo como una experiencia consciente y ensamblada cognitivamente en circuitos corticales (LeDoux, 2015; LeDoux, 2017). Es decir, se está usando una misma palabra para describir diferentes cuestiones. El problema se agrava, además, cuando algunos de estos significados se superponen con el concepto que se emplea en el habla cotidiana, puesto que puede generar una interpretación por defecto con relación a la experiencia consciente que toda persona ha experimentado alguna vez. Esto puede llevar fácilmente a interpretar que cualquier organismo que muestre alguna de estas respuestas estará experimentando de forma consciente algo similar a lo que las personas entendemos por miedo. En un intento de evitar este caos conceptual, LeDoux propone restringir el uso de los términos que hacen referencia a estados mentales – como el de miedo – para referirse únicamente a estados mentales y no a los circuitos que controlan las respuestas conductuales y fisiológicas (LeDoux, 2014; LeDoux and Brown, 2017; LeDoux, 2017).

Para LeDoux los estados que carecen de la participación del “yo” no serían emociones (LeDoux and Brown, 2017). Es decir, según su visión, una emoción sería la experiencia que ocurre cuando el individuo es consciente de estar viviendo una situación particular. Específicamente en el caso del miedo, este sería el sentimiento consciente experimentado por un individuo capaz de interpretar los contenidos de esas experiencias en términos de implicaciones para el bienestar de sí mismo (LeDoux, 2015). En relación con esto, el investigador propone un modelo con un fuerte componente evolutivo. En este modelo se plantea un doble circuito para el procesamiento de las amenazas: uno subcortical centrado en la amígdala que inicia los comportamientos defensivos y otro cortical que da lugar a la experiencia consciente del miedo (LeDoux and Brown, 2017). Los organismos capaces de ser conscientes del estado de su propio cerebro podrían experimentar aquello a lo que comúnmente nos referimos como miedo. Por tanto, como decíamos, este enfoque cuestiona que las emociones sean similares entre los humanos y el resto de los animales, dada su naturaleza consciente y subjetiva. En definitiva, LeDoux sostiene que las experiencias emocionales – al igual que el resto de las experiencias conscientes – están ensambladas cognitivamente por circuitos corticales y basadas en modelos mentales y conceptualizaciones de situaciones (Mobbs et al., 2019). De modo similar, otros autores proponen una teoría constructivista de las emociones (Clore and Ortony, 2013; Barret and Russell, 2015; Barret, 2017). Concretamente Barrett – que revolucionó hace unos años la ciencia afectiva cuestionando directamente la concepción común tan consolidada que había hasta ese momento – apunta a que las emociones son experiencias conscientes construidas psicológicamente

y etiquetadas utilizando palabras aprendidas y vinculadas a la cultura a la que pertenece cada individuo (Barrett, 2006b; Barrett, 2006a; Barrett et al., 2007; Barrett, 2009). En palabras de la investigadora, LeDoux abrió el debate de la confusión que llevaba años generándose en base a la idea errónea que rodeaba el concepto del “circuito de miedo”. Dicha idea llevó a la creencia generalizada de que los humanos y otros mamíferos comparten, no solo los comportamientos defensivos no conscientes, sino también la propia sensación de miedo (Barrett, 2019). De algún modo era como el elefante en la habitación del que nadie hablaba, pero cuya presencia se hacía cada vez más evidente a través de ciertos enigmas del campo que las teorías contemporáneas sobre el miedo no permitían explicar (para ampliar sobre esta cuestión revisar LeDoux and Pine, 2016; LeDoux, 2017). Por todo ello, como adelantábamos, LeDoux aboga por la generación de un riguroso marco conceptual que evite el uso de términos de estado mental para describir comportamientos en animales que no se basan en dichos estados (LeDoux, 2015, 2019). Por ejemplo, de forma específica, propone reemplazar en investigación animal palabras como “estímulos de miedo”, “circuitos de miedo” y “respuestas de miedo” por “estímulos amenazantes”, “circuitos de supervivencia” y “respuestas defensivas” (LeDoux, 2012; LeDoux, 2017; LeDoux and Daw, 2018).

Como era de esperar, esta teoría ha generado controversia y detractores, sobre todo en cuanto a que las experiencias subjetivas del miedo y de la ansiedad puedan separarse de las respuestas defensivas inconscientes (Fanselow and Pennington, 2017, 2018). Para una respuesta a estos contraargumentos ver Pine and LeDoux, 2017. Aunque gran parte de las discrepancias entre la visión de LeDoux y otros investigadores importantes de este campo es semántica, no es una divergencia banal. Las palabras que utilizamos condicionan nuestro pensamiento y la forma en la que enfocamos la investigación (LeDoux, 2019). Esto es, al estudiar el miedo existe una gran disparidad con respecto a cómo plantear la investigación e incluso, como hemos visto, en cuanto a cómo definirlo (Mobbs et al., 2019). Pero es que además la terminología que decidimos emplear influye marcadamente en lo que otros interpretarán sobre nuestra propia investigación (LeDoux, 2015). Asimismo, la utilización de esta conceptualización laxa puede llevar al extravío de las expectativas sobre lo que el modelo animal puede descubrirnos. Y, de hecho, esto muestra un notable paralelismo con la investigación en otras áreas como la del dolor, donde se enfatiza cada vez más la importancia de comprender la experiencia del dolor subjetivo. En efecto, igualmente se cuestiona si los animales que carecen de consciencia fenoménica representan un modelo adecuado en los estudios sobre el desarrollo de fármacos analgésicos (Heyes, 2008). En este sentido, la investigación del dolor no puede implicar únicamente los mecanismos de la nocicepción, sino también aquellos que son mediadores de la experiencia subjetiva (Woo et al., 2017). De forma similar, numerosas compañías farmacéuticas se han retirado

de la investigación en trastornos mentales (Miller, 2010) y, concretamente, el desarrollo de nuevos fármacos ansiolíticos ha generado un resultado clínico decepcionante en los últimos años (Griebel, 2013). Una de las razones que se proponen para explicar esta incapacidad para traducir los resultados obtenidos en modelo animal en fármacos eficaces en humanos es que el planteamiento desde el que se parte no es correcto. Pretender aliviar los sentimientos de miedo o de ansiedad de las personas con fármacos que lo que han demostrado es que logran cambiar los comportamientos defensivos y la excitación fisiológica en el modelo animal, podría ser un enfoque erróneo (LeDoux and Pine, 2016). En conclusión, la idea de que el comportamiento de los animales en contextos de amenaza es la vía para comprender la experiencia subjetiva podría estar lastrando en parte el esfuerzo por desarrollar tratamientos adecuados (LeDoux, 2015, 2019). Pero es que además este debate incluso adquiere interés desde el punto de vista de la psiquiatría humana. De forma general, los tratamientos de determinados trastornos de la salud mental deben abordar un doble objetivo: por un lado, las experiencias conscientes del individuo y, por otro, los síntomas fisiológicos. De forma específica, LeDoux ha puesto el acento recientemente en la comprensión de las experiencias subjetivas asociadas para una mejor intervención en los trastornos de ansiedad y en las fobias (LeDoux, 2015; LeDoux and Pine, 2016). En este aspecto, para un mayor conocimiento de los mecanismos que subyacen a dichas experiencias es inevitable recurrir a la investigación sobre la consciencia y elegir modelos adecuados para su estudio.

En medio de todo este revuelo LeDoux y Daw propusieron una taxonomía de la conducta defensiva sobre la base de procesos psicológicos conocidos y en relación con los circuitos neuronales subyacentes (LeDoux and Daw, 2018). Dicha taxonomía comprende tres categorías de reacciones – que incluyen los reflejos, los patrones de reacción fijos y los hábitos – y tres categorías de acciones más flexibles y dirigidas a objetivos, que contienen las respuestas instrumentales aprendidas y las acciones basadas en la deliberación inconsciente o consciente. Dean Mobbs, aun compartiendo en buena parte esta visión, se muestra pesimista con respecto al cambio de terminología radical y propone una alternativa subcategorizando el miedo en dos formas: reactivo y cognitivo (Mobbs, 2018). En cualquier caso, parece importante que, como mínimo, los investigadores utilicen definiciones más precisas que dejen claro la utilización personal que están haciendo del término miedo.

4. ANTROPOMORFISMO & BIENESTAR ANIMAL

En los dos apartados anteriores hemos desentrañado la importancia de evitar trasladar estados subjetivos humanos al comportamiento animal sin la evidencia de que dichas atribuciones pueden realizarse. Asimismo, hemos puesto el énfasis en la idea de que este debate no es una mera cuestión terminológica, sino que plantea a la ciencia una controversia a nivel conceptual que además puede tener consecuencias prácticas e incluso éticas. Por ejemplo, algunos autores señalan que en materia de bienestar animal no debemos permitirnos el lujo de acudir al antropocentrismo, interpretando la realidad de los animales desde las experiencias y los valores humanos (Bradshaw and Casey, 2007). No obstante, el hecho de no considerar cuestiones relacionadas con la consciencia a la hora de valorar su bienestar puede resultar molesto (Dawkins, 2017), pues parece que cuantas más similitudes se encuentren entre los animales y los humanos, más deben ser valorados y protegidos (Shettleworth, 2010a). Contrariamente a esto, se podría argüir que el sesgo antropomórfico representa una visión injusta. Al distorsionar la verdadera naturaleza del resto de los animales concibiendo sus mentes como versiones de la nuestra menos sofisticadas (Povinelli, 2004), directamente los colocamos en una posición inferior, asumiendo que sus capacidades son similares pero limitadas. En cualquier caso, para muchos la certeza de que los animales tienen sentimientos conscientes sigue siendo la base sobre la que construyen los argumentos a favor de una mayor consideración moral en el trato que se les da (Dawkins, 2017). Es justamente esa creencia de que los animales no humanos sufren, sienten y experimentan de manera parecida a nosotros lo que empuja a muchas personas a preocuparse por cuestiones relacionadas con el bienestar animal (Dawkins, 2015). Sin embargo, esta estrategia puede resultar infructuosa e incluso podría debilitar parte del argumentario a favor de esta causa, entre otros motivos, por la propia idiosincrasia de la investigación de la consciencia animal. Además, conviene señalar que la acogida de esta conceptualización rigurosa y científica no desplaza de ningún modo la consideración ética hacia los animales no humanos.

La propia Dawkins reconoce que aunque tiempo atrás ella misma incluía en su definición de bienestar lo que los animales sienten, actualmente lo considera un error. Es necesario fomentar una ciencia del bienestar animal firmemente arraigada en lo observable y aquello que pueda ser probado científicamente. Dar un peso excesivo a cuestiones que hoy por hoy no son demostrables – como la experiencia consciente en los animales – no juega precisamente a favor de esta ciencia (Dawkins, 2017). De nuevo vemos que surge toda una problemática asociada a la terminología que se emplea habitualmente. El hecho de recurrir a conceptos que utilizamos para caracterizar las construcciones psicológicas – como el miedo, el placer e incluso la propia palabra emoción – puede estar dificultando

el avance en la ciencia (Mobbs et al., 2019), pues partir de concepciones equivocadas difícilmente puede llevar a conclusiones correctas. Al ser palabras con una carga conceptual vinculada a las experiencias conscientes que hemos sentido alguna vez, es fácil asumir que la consciencia siempre está detrás de las respuestas conductuales que observamos, independientemente de que en realidad puedan estar controladas por circuitos diferentes (Dawkins, 2017). Incluso, remontándonos tiempo atrás, el propio Tinbergen declaró explícitamente que en fenómenos como el hambre, la ira o el miedo, el problema no era si los animales experimentaban experiencias conscientes, sino la imposibilidad de utilizar los métodos científicos para confirmarlo. De tal manera que la atribución de estos y otros estados mentales no suponía más que una mera conjetura (Tinbergen, 1951).

Por otra parte, Dawkins resalta la paradoja que se produce en el campo del bienestar cuando los investigadores quieren abordarlo científicamente pero incluyen el estudio de la consciencia animal (Dawkins, 2015). Lo más común, señala, es encontrar investigadores que aun reconociendo los problemas vinculados a la consciencia desarrollan su investigación como si tal cuestión no existiera, utilizando palabras como “emoción” o “afecto”. Esta ambigüedad en el uso de sustitutos templados lleva a confusión y eleva los riesgos de tal contrasentido a su máxima expresión. A este respecto, de los tres enfoques principales que actualmente se aceptan al definir el bienestar animal (Fraser et al., 1997), uno hace referencia a las experiencias subjetivas del individuo, centrándose fundamentalmente en emociones negativas como el dolor o el miedo (Broom and Johnson, 1993; Dawkins, 1980). Incluso hoy día la ciencia del bienestar trata de poner el énfasis en la importancia de los estados subjetivos positivos (Boissy et al., 2007; Mellor, 2016), como el placer. Con el objetivo de evitar esta contradicción, Dawkins propone un doble criterio al definir bienestar – en términos de salud y de las necesidades y preferencias – que no incluya necesariamente las experiencias conscientes en los animales (Dawkins, 2008). Estos criterios además podrían ser aceptados por personas con diferentes puntos de vista y a su vez ser lo suficientemente prácticos en cuanto a su aplicación (Dawkins, 2017).

En este marco, si se define el bienestar como una situación en la que las necesidades biológicas del individuo están satisfechas, conviene tener en cuenta que dichas necesidades no son las mismas en todas las especies, puesto que son el resultado de una historia evolutiva determinada. Por ejemplo, las necesidades biológicas del ser humano no coinciden necesariamente con las del perro o las del gato, de tal forma que a la hora de valorar el bienestar no trataríamos de asemejarlas insistentemente. De un modo similar, la exposición a diferentes presiones del entorno ha fomentado el desarrollo de una amplia variedad de procesos cognitivos (Zentall et al., 2008). En este sentido, nadie dudaría de la extraordinaria sensibilidad olfativa de los perros (Manteca, 2003). De hecho, se ha sugerido incluso

que las actividades basadas en el olfato podrían representar una herramienta útil para mejorar el bienestar de los individuos de esta especie (Duranton and Horowitz, 2019). Obviamente, parece poco probable que dichas actividades se incluyeran como fundamentales en cuanto a la consecución del bienestar de las personas. En este aspecto, en el caso concreto de los humanos es posible que lo más extraordinario sea precisamente la forma en la que procesamos la información. Como se sugirió en otro apartado del capítulo, la existencia de una línea de continuidad evolutiva no implica que no pueda haber diferencias entre los rasgos mostrados por especies relacionadas. Tampoco puede llevar a concluir que el resto de los animales experimentan experiencias subjetivas similares a las nuestras. Por tanto, atribuirles ciertos estados mentales idénticos a los del humano no tiene por qué ser positivo ni práctico desde el punto de vista del bienestar.

Por último, Barnard y Hurst señalan la dificultad ligada al uso de etiquetas conceptuales – como el estrés o el *coping* – cuya definición y medición son complicadas y generan importantes desacuerdos. Esto es debido, entre otros motivos, a la creencia de que determinadas respuestas conductuales y fisiológicas van asociadas necesariamente a circunstancias estresantes, cuando no siempre es así (Barnard and Hurst, 1996). Es decir, el análisis de indicadores que son perfectamente medibles y aparentemente objetivos – como los parámetros comportamentales y fisiológicos – puede ser complejo, pues estas variables mantienen un punto de subjetividad en su interpretación (Bradshaw and Casey, 2007). En consecuencia, no es infrecuente observar discrepancias en los protocolos a la hora de incluir ciertas medidas relacionadas con el comportamiento del animal (Polgár, et al., 2019), pues a menudo resulta difícil valorarlas en términos de bienestar adecuado. Por ejemplo, el comportamiento de vigilancia puede ilustrar este problema. Su expresión puede interpretarse como una respuesta defensiva en un contexto amenazante, pero también podría reflejar el interés ante la presencia de estímulos novedosos como los visitantes (Sherwen, 2015; Salas, 2017). Esta ambigüedad puede hacer complicado llegar a una conclusión en términos de bienestar basándose únicamente en esta medida de comportamiento. Sin embargo, los parámetros fisiológicos tampoco están exentos de problemas. Actualmente, el indicador fisiológico que más se utiliza para valorar la respuesta de estrés es la concentración de glucocorticoides como representación de la activación del eje HPA. Su utilidad con respecto a la evaluación del bienestar animal no siempre es clara, ya que su valoración muestra dificultades. A este respecto, la activación del eje HPA reflejada en una mayor concentración de glucocorticoides no implica necesariamente consecuencias negativas (Ralph and Tilbrook, 2016), puesto que su incremento puede estar relacionado con situaciones que no son amenazantes para el individuo ni perjudican su bienestar, como las conductas de juego o el comportamiento sexual, entre otras (Broom and Johnson, 1993; Otovic and Hutchinson, 2015).

5. ANTROPOMORFISMO, BIENESTAR DE LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA & ETOLOGÍA CLÍNICA

A lo largo del capítulo hemos ido desgranando los riesgos de etiquetar el comportamiento de los animales con términos cotidianos de nuestro lenguaje vulgar en diferentes áreas del conocimiento. Es importante acercarse también al campo del bienestar de los animales de compañía y al de la etología clínica el actual debate sobre el uso tan extendido de un vocabulario antropomórfico y la confusión conceptual asociada. El objetivo no es otro que el de disponer de recursos suficientes y adecuados con los que poder elaborar suposiciones razonadas sobre la vida cognitiva y emocional de las especies domésticas con las que habitualmente se trabaja en estas áreas. En relación con esto, no es raro que la gente que convive con animales les atribuya numerosas emociones, como el miedo, la ira, la alegría, la culpa, los celos, la empatía o la vergüenza, entre otras (Morris et al., 2008; Konok et al., 2015; Martens et al., 2016). Lamentablemente, se genera un problema cuando las suposiciones – sustentadas en un lenguaje común intoxicado de las propiedades subjetivas – llevan asociadas un bagaje social y moral (Mitchell, 2005). Sin duda, el hecho de utilizar palabras con una carga implícita, así como predicciones intuitivas basadas en cómo las personas sienten o razonan, conlleva riesgos en cuanto a la convivencia con otros animales.

Con todo, cabe señalar que esta fuerte tendencia de atribuir sentimientos y motivaciones humanas puede contribuir en cierta medida a algunos aspectos positivos de la relación de las personas con el resto de los animales. Por ejemplo, en un estudio en el que valoraron la influencia del antropomorfismo en los comportamientos prosociales hacia los animales, observaron una mayor disposición a adoptar perros de refugios en los participantes que mostraban mayor tendencia al antropomorfismo (Butterfield et al., 2012). Por otra parte, parece que la propensión a atribuir características humanas a los animales puede alterar los hábitos alimenticios, pues estaría asociada a una reducción en el consumo de productos de origen animal (Bastian et al., 2012). No obstante, también encontramos algunos aspectos negativos. Entre otros, Serpell señala que la selección antropomórfica a favor de rasgos que facilitan la atribución de estados mentales humanos puede ser responsable de algunos de los problemas de bienestar más graves de los animales de compañía. Concretamente hace referencia a las discapacidades físicas presentes en la mayoría de las razas braquiocefálicas y a ciertas distorsiones a nivel comportamental (Serpell, 2003). Además, en dos estudios en los que se investigó la influencia de la relación humano-animal en la alimentación y en el

cuidado de los gatos y de los perros, encontraron que una mayor humanización de ambas especies estaba asociada al sobrepeso (Kienzle et al., 1998; Kienzle and Bergler, 2006). Por tanto, en cuanto al vínculo con los animales domésticos – principalmente perro y gato –, el antropomorfismo parece mostrar una doble cara. Por un lado, ha dado lugar a un conjunto de relaciones entre especies sin precedentes en ninguna otra parte del reino animal (Serpell, 2003) y contribuiría a la creación de los lazos que establecen las personas con estos animales. Sin embargo, por otro lado, interpretar el comportamiento de los perros y los gatos desde el filtro de los valores humanos puede resultar una amenaza para ese vínculo (Haupt, 1996).

En relación con esto último, estas actitudes sesgadas parecen favorecer también el desarrollo de problemas de comportamiento en el contexto doméstico (Bradshaw and Casey, 2007). En el caso concreto de los perros, las interpretaciones humanas de la conducta de esta especie son antropomórficas con mucha frecuencia (Serpell, 2003; Horowitz, 2009; Horowitz and Hecht, 2014). Una situación clásica es la de atribuirles culpa o remordimiento al observar su comportamiento, por ejemplo, cuando el propietario llega y el animal ha orinado dentro de la casa. Esto así porque la vía más fácil e intuitiva es simplemente extrapolar lo que nosotros, como humanos, podríamos sentir en un contexto similar. Y más si se ve al animal adoptando una postura encogida o la llamada “mirada de culpabilidad” (Voith and Borchelt, 1996; Horowitz, 2009), aparentemente tal y como haría una persona culpable que evita mirar a su inculpador. De hecho, hay autores que sugieren que entre los mecanismos cognitivos que respaldan las interpretaciones antropomórficas estarían los de coincidencia motora, que se activarían al observar animales que mostraran comportamientos familiares para los humanos (Urquiza-Haas, 2015). El problema con este tipo de explicaciones antropomórficas es que realmente no explican nada y carecen del poder de predecir el comportamiento futuro de ese individuo (Wynne, 2007b). Con lo cual, llevan a un callejón sin salida en cuanto a la comprensión del comportamiento animal. Nuevamente, es necesario no precipitarse en las conclusiones y disponer siempre de hipótesis alternativas. En este aspecto, Horowitz mostró de forma clara a través de un interesante estudio que los propietarios interpretaban erróneamente como una expresión de culpa lo que en realidad era el resultado de una respuesta aprendida como consecuencia del manejo asociado (Horowitz, 2009).

En este mismo orden de ideas, conviene remarcar que las concepciones incorrectas sobre lo que motiva la conducta de los animales influyen en buena medida en la manera en que el propietario gestiona la situación (Todd, 2018). Por ejemplo, si un perro muestra destructividad en casa y la persona interpreta que se ha comportado mal de forma intencionada y que actúa por venganza – pues la conducta inadecuada únicamente aparece cuando lo dejan solo –, la probabilidad de que lleve

a cabo una intervención coercitiva posiblemente sea mayor. Y es importante tener en cuenta que estas acciones de confrontación pueden estar asociadas con una mayor ocurrencia de comportamientos indeseados (Hiby et al., 2004; Herron et al., 2009) y también pueden incrementar las respuestas defensivas del animal (Mills, 2002). En este sentido, en un estudio en el que evaluaron las respuestas de los perros a diferentes métodos de entrenamiento encontraron que los individuos cuyos propietarios utilizaban técnicas punitivas parecían tener mayor probabilidad de desarrollar respuestas agresivas (Blackwell et al., 2008), con el riesgo que esto conlleva. Sin olvidar, además, los efectos negativos que el uso de este tipo de técnicas tiene sobre el bienestar de los animales (Hiby et al., 2004; Deldalle & Gaunet, 2014; Ziv, 2017).

Por último, los expertos que ejercen la etología clínica en ocasiones tampoco escapan de estos problemas semánticos y sus consecuencias. De hecho, con cierta frecuencia los profesionales de esta especialidad veterinaria acaban recurriendo a conceptos antropomórficos para facilitar la comprensión de determinadas explicaciones. A este respecto, incluso hay autores que instan a utilizar el antropomorfismo como herramienta de comunicación válida (Karlsson, 2012). Sin embargo, ya se ha argumentado a lo largo del capítulo las consecuencias que puede tener el pretender explicar el comportamiento utilizando recursos teóricos empobrecidos. Por poner un ejemplo concreto de este campo, entre las recomendaciones que se dan cuando un perro muestra respuestas defensivas en un contexto de amenaza (lo que habitualmente se etiquetaría como miedo) encontramos la de ignorar al animal “para no reforzar su miedo” (Lindsay, 2005; Levine, 2009; Palestrini, 2009). Estas sugerencias no suelen ir acompañadas de estudios que avalen su eficacia. Tal vez una mayor reflexión con respecto a las diferentes respuestas que se pueden producir en un contexto defensivo – reacciones corporales, patrones de comportamiento innatos y acciones instrumentales, entre otras – en lugar de intuirlo como una especie de pack, proporcionaría un marco más riguroso para debatir el sentido y la utilidad de esta reiterada recomendación.

6. CONCLUSIONES

La creencia de que hemos heredado de nuestros ancestros mamíferos los estados mentales, en general, y las emociones, en particular, ha allanado el camino a nuestra tendencia antropomórfica innata incluso dentro de la ciencia. De tal manera que se asume con facilidad que cuando los humanos y otros animales realizan comportamientos parejos en contextos concretos, esto conlleva también la experiencia común de sentimientos similares. Por tal motivo, el presente capítulo se ha centrado en

plantear la necesidad de utilizar un marco conceptual que explique mejor lo que ocurre en el cerebro del animal. Entre otras cosas para no tener que recurrir constantemente a adaptar de forma más o menos burda la terminología aplicada a las personas. De hecho, servirse constantemente de estas palabras que usamos para describir nuestras experiencias subjetivas no parece que vaya a ayudar precisamente a evitar el sesgo antropomórfico.

La ciencia no puede desarrollarse en base a nuestras tendencias antropocéntricas, tomándonos descaradamente como modelos al interpretar la naturaleza de otras mentes, ni a las antropomórficas, en un intento constante de buscar las similitudes. La mayoría de los estudios se basan en meras analogías con el comportamiento humano o en episodios anecdóticos. Las intuiciones – casi a modo de corazonada – derivadas de este tipo de enfoques no pueden considerarse conclusiones científicas. Los procesos cognitivos no se pueden observar directamente, son inferencias del comportamiento, esto es, saltos especulativos que conviene analizar cuidadosamente antes de verter una conclusión. Por otra parte, en ocasiones los análogos de los paradigmas experimentales aceptados para los humanos pueden no permitir una interpretación clara en el caso de los animales, como ocurre, por ejemplo, en la prueba del espejo. Y en la otra cara de la moneda de este debate también se pone en jaque en cierta medida la utilidad del modelo animal para determinadas cuestiones.

Enfocándonos en la ciencia del bienestar, hemos destacado la idea de que esta no tiene que basarse en suposiciones con respecto a qué especies tienen experiencias conscientes, ya que esto puede suponer un obstáculo para su avance. Asimismo, hemos procurado aclarar que este debate no descansa sobre la interpretación más radical de la filosofía cartesiana, ni plantea la posibilidad de que los animales sean simples máquinas de estímulos-respuestas. No obstante, que muchos animales puedan utilizar funciones cognitivas realmente complejas no implica necesariamente que posean la capacidad de experimentar experiencias conscientes. Sea como sea, es fundamental subrayar que la generación de un mayor conocimiento sobre el comportamiento y la cognición de los animales en todo caso debe utilizarse para comprenderlos mejor y mejorar su bienestar, en ningún caso para justificar prácticas abusivas. Por otro lado, parece razonable proponer también el acercamiento de este amplio debate a la etología clínica. La integración de este conocimiento podría ser de ayuda para evitar el riesgo de la construcción de concepciones equivocadas, que, a su vez, pueden generar consecuencias indeseadas.

En definitiva, cuando se utilizan conceptos tan ambiguos y escurridizos a nivel empírico la controversia está servida. En relación con esto, hemos recalcado la necesidad de aplicar definiciones precisas, adoptar estándares rigurosos y disponer siempre de hipótesis alternativas a la hora de

interpretar los resultados de los estudios. En cualquier caso, el objetivo de este capítulo no es aportar soluciones concretas, sino hacer eco de un problema presente en la ciencia, en general, y en nuestro campo, en particular. Un problema que debe debatirse y, en la medida de lo posible, resolverse.

7. REFERENCIAS

- Andrews, K. (2015). A role for folk psychology in animal cognition research. In: A. Blank (Ed.), *Animals: Basic Philosophical Concepts*. Munich: Philosophia.
- Arnold, K., & Zuberbühler, K. (2006). Language evolution: Semantic combinations in primate calls. *Nature*, 441(7091), 303. doi: 10.1038/441303a
- Barnard, C. J., & Hurst, J.L. (1996). Welfare by design: The natural selection of welfare criteria. *Animal Welfare*, 5(4), 405-433.
- Barrett, L. F. (2006a). Solving the emotion paradox: Categorization and the experience of emotion. *Personality and Social Psychology Review*, 10(1), 20–46. doi: 10.1207/s15327957pspr1001_2
- Barrett, L. F. (2006b). Are emotions natural kinds? *Perspectives on Psychological Science*, 1(1), 28–58. doi: 10.1111/j.1745-6916.2006.00003.x
- Barrett, L. F. (2009). The future of psychology: Connecting mind to brain. *Perspectives on Psychological Science*, 4(4), 326–339. doi: 10.1111/j.1745-6924.2009.01134.x
- Barrett, L. F. (2017). The theory of constructed emotion: An active inference account of interoception and categorization. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 12(11), 1-23. doi:10.1093/scan/nsw154
- Barrett, L. F. (2019). Survival: The first 3.8 billion years. *Nature*, 572(7770), 437–438. doi:10.1038/d41586-019-02475-x

- Barrett, L. F., Lindquist, K. A., Bliss-Moreau, E., Duncan, S., Gendron, M., Mize, J., & Brennan, L. (2007). Of mice and men: Natural kinds of emotions in the mammalian brain? A response to Panksepp and Izard. *Perspectives on Psychological Science*, 2(3), 297–312. doi: 10.1111/j.1745-6916.2007.00046.x
- Barrett, L. F., & Russell, J. A. (2015). *The psychological construction of emotion*. New York: Guilford Press.
- Bartal, I. B.-A., Decety, J., & Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science*, 334(6061), 1427–1430. doi: 10.1126/science.1210789
- Bastian, B., Loughnan, S., Haslam, N., & Radke, H. R. M. (2012). Don't mind meat? The denial of mind to animals used for human consumption. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 38(2), 247–256. doi: 10.1177/0146167211424291
- Bensky, M. K., Gosling, S. D., & Sinn, D. L. (2013). The world from a dog's point of view: A review and synthesis of dog cognition research. *Advances in the Study of Behavior*, 45, 209–406. doi: 10.1016/b978-0-12-407186-5.00005-7
- Blackwell, E. J., Twells, C., Seawright, A., & Casey, R. A. (2008). The relationship between training methods and the occurrence of behavior problems, as reported by owners, in a population of domestic dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 3(5), 207–217. doi: 10.1016/j.jveb.2007.10.008
- Blackwell, E. J., Bradshaw, J. W., & Casey, R. A. (2013). Fear responses to noises in domestic dogs: Prevalence, risk factors and co-occurrence with other fear related behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 145(1-2), 15–25. doi: 10.1016/j.applanim.2012.12.004
- Boesch, C. (1991). Teaching among wild chimpanzees. *Animal Behaviour*, 41(3), 530–532. doi: 10.1016/s0003-3472(05)80857-7
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., ... Aubert, A. (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior*, 92(3), 375–397. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.02.003
- Bolles, R. C., & Fanselow, M. S. (1980). A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences*, 3(2), 291–301. doi: 10.1017/s0140525x0000491x

- Bourjade, M., Thierry, B., Call, J., & Dufour, V. (2012). Are monkeys able to plan for future exchange? *Animal Cognition*, *15*(5), 783–795. doi: 10.1007/s10071-012-0502-1
- Bradshaw, J. W., & Casey, R. A. (2007). Anthropomorphism and anthropocentrism as influences in the quality of life of companion animals. *Animal Welfare*, *16*, 149-154.
- Broom, D. M., & Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Brown, R., Lau, H., & LeDoux, J. E. (2019). The misunderstood higher-order approach to consciousness. doi:10.31234/osf.io/xpy8h
- Buckner, C. (2013). Morgan's Canon, meet Hume's Dictum: avoiding anthropofabulation in cross-species comparisons. *Biology & Philosophy*, *28*(5), 853–871. doi:10.1007/s10539-013-9376-0
- Burghardt, G. M. (2007). Critical anthropomorphism, uncritical anthropocentrism, and naïve nominalism. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, *2*(1), 136-138. doi: 10.3819/ccbr.2008.20009
- Butterfield, M. E., Hill, S. E., & Lord, C. G. (2012). Mangy mutt or furry friend? Anthropomorphism promotes animal welfare. *Journal of Experimental Social Psychology*, *48*(4), 957–960. doi: 10.1016/j.jesp.2012.02.010
- Caceres, M., Lachuer, J., Zapala, M. A., Redmond, J. C., Kudo, L., Geschwind, D. H., ... Barlow, C. (2003). Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(22), 13030–13035. doi: 10.1073/pnas.2135499100
- Call, J., & Tomasello, M. (2008). Does the chimpanzee have a theory of mind? 30 years later. *Trends in Cognitive Sciences*, *12*(5), 187–192. doi: 10.1016/j.tics.2008.02.010
- Caporael, L. R., Heyes, C. M. (1997). Why anthropomorphize? Folk psychology and other stories. In: R. W. Mitchell, N. S. Thompson, H. L. Miles (Ed.), *Anthropomorphism, Anecdotes and Animals* (pp.59–73). Albany, NY: State University of New York Press.
- Carruthers, P. (2008). Meta-cognition in animals: A skeptical look. *Mind & Language*, *23*(1), 58–89. doi: 10.1111/j.1468-0017.2007.00329.x

- Clayton, N. S., Griffiths, D. P., Emery, N. J., & Dickinson, A. (2001). Elements of episodic-like memory in animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1413), 1483–1491. doi:10.1098/rstb.2001.0947
- Clore, G. L., & Ortony, A. (2013). Psychological construction in the OCC model of emotion. *Emotion review*, 5(4), 335–343. doi:10.1177/1754073913489751
- Cook, R., Bird, G., Catmur, C., Press, C., & Heyes, C. (2014). Mirror neurons: From origin to function. *Behavioral and Brain Sciences*, 37(2), 177–192. doi: 10.1017/s0140525x13000903
- Crystal, J. D. (2009). Elements of episodic-like memory in animal models. *Behavioural Processes*, 80(3), 269–277. doi: 10.1016/j.beproc.2008.09.009
- Custance, D., & Mayer, J. (2012). Empathic-like responding by domestic dogs (*Canis familiaris*) to distress in humans: an exploratory study. *Animal Cognition*, 15(5), 851–859. doi: 10.1007/s10071-012-0510-1
- Darwin, C. (1871). *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- Darwin, C. (1872). *The expression of the emotions in man and animals*. London: John Murray.
- Dawkins, M. S. (1980). *Animal suffering: The science of animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Dawkins, M. S. (2008). The science of animal suffering. *Ethology*, 114(10), 937–945. doi: 10.1111/j.1439-0310.2008.01557.x
- Dawkins, M. S. (2015). Animal welfare and the paradox of animal consciousness. *Advances in the Study of Behavior*, 47, 5–38. doi: 10.1016/bs.asb.2014.11.001
- Dawkins, M. S. (2017). Animal welfare with and without consciousness. *Journal of Zoology*, 301(1), 1–10. doi: 10.1111/jzo.12434
- De Waal, F. B. (1997). Are we in anthropodenial? *Discover*, 18, 50-53.
- De Waal, F. B., & Ferrari, P. F. (2010). Towards a bottom-up perspective on animal and human cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(5), 201–207. doi: 10.1016/j.tics.2010.03.003

Capítulo 3

- Deldalle, S., & Gaunet, F. (2014). Effects of 2 training methods on stress-related behaviors of the dog (*Canis familiaris*) and on the dog-owner relationship. *Journal of Veterinary Behavior*, 9(2), 58–65. doi: 10.1016/j.jveb.2013.11.004
- Dickinson, A. (1980). *Contemporary animal learning theory*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Dickinson, A. (2012). Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1603), 2733–2742. doi: 10.1098/rstb.2012.0220
- Durantón, C., & Horowitz, A. (2019). Let me sniff! Nosework induces positive judgment bias in pet dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 211, 61–66. doi: 10.1016/j.applanim.2018.12.009
- Elston, G. N., Benavides-Piccione, R., & Defelipe, J. (2001). The pyramidal cell in cognition: A comparative study in human and monkey. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), RC163. doi: 10.1523/jneurosci.21-17-j0002.2001
- Fanselow, M. S., & Pennington, Z. T. (2017). The danger of LeDoux and Pine's two-system framework for fear. *American Journal of Psychiatry*, 174(11), 1120–1121. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17070818
- Fanselow, M. S., & Pennington, Z. T. (2018). A return to the psychiatric dark ages with a two-system framework for fear. *Behaviour Research and Therapy*, 100, 24–29. doi: 10.1016/j.brat.2017.10.012
- 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(3), 340–374. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.016
- Fraser, D., Weary, D. M., Pajor, E. A., & Milligan, B. N. (1997). A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Animal Welfare*, 6(3), 187–205.
- Gallup, G. G. (1970). Chimpanzees: Self-Recognition. *Science*, 167(3914), 86–87. doi: 10.1126/science.167.3914.86

- Gallup, G. G. (1994). Self-recognition: research strategies and experimental design. In: S. T. Parker, R. W. Mitchell, M. L. Boccia (Ed.), *Self-awareness in animals and humans: developmental perspectives* (pp. 35-50). New York: Cambridge University Press.
- Griebel, G., & Holmes, A. (2013). 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(9), 667–687. doi: 10.1038/nrd4075
- Hardingham, G. E., Pruunsild, P., Greenberg, M. E., & Bading, H. (2018). Lineage divergence of activity-driven transcription and evolution of cognitive ability. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(1), 9–15. doi: 10.1038/nrn.2017.138
- He, Z., Han, D., Efimova, O., Guijarro, P., Yu, Q., Oleksiak, A., ... Khaitovich, P. (2017). Comprehensive transcriptome analysis of neocortical layers in humans, chimpanzees and macaques. *Nature Neuroscience*, 20(6), 886–895. doi: 10.1038/nn.4548
- Herron, M. E., Shofer, F. S., & Reisner, I. R. (2009). Survey of the use and outcome of confrontational and non-confrontational training methods in client-owned dogs showing undesired behaviors. *Applied Animal Behaviour Science*, 117(1-2), 47–54. doi: 10.1016/j.applanim.2008.12.011
- Heyes, C. (1994). Reflections on self-recognition in primates. *Animal Behaviour*, 47(4), 909–919. doi: 10.1006/anbe.1994.1123
- Heyes, C. (1995). Self-recognition in primates: further reflections create a hall of mirrors. *Animal Behaviour*, 50(6), 1533–1542. doi: 10.1016/0003-3472(95)80009-3
- Heyes, C. (1998). Theory of mind in nonhuman primates. *Behavioral and Brain Sciences*, 21(1), 101–148. doi: 10.1017/s0140525x98000703
- Heyes, C. (2008). Beast machines? Questions of animal consciousness. In: M. Davies, L. Weiskrantz (Ed.), *Frontiers of consciousness* (pp. 259 – 274). Oxford: Oxford University Press.
- Heyes C. (2012). Simple minds: a qualified defence of associative learning. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1603), 2695–2703. doi:10.1098/rstb.2012.0217

Capítulo 3

- Heyes, C. (2015). Animal mindreading: what's the problem? *Psychonomic Bulletin & Review*, 22(2), 313–327. doi: 10.3758/s13423-014-0704-4
- Hiby, E. F., Rooney, N. J., & Bradshaw, J. W. (2004). Dog training methods: their use, effectiveness and interaction with behaviour and welfare. *Animal Welfare*, 13, 63-69.
- Horowitz, A. (2009). Disambiguating the “guilty look”: Salient prompts to a familiar dog behaviour. *Behavioural Processes*, 81(3), 447–452. doi:10.1016/j.beproc.2009.03.014
- Horowitz, A., & Hecht, J. (2014). Looking at dogs: Moving from anthropocentrism to canid umwelt. In: A. Horowitz (Ed.), *Domestic Dog Cognition and Behavior* (pp. 201-219). Berlin: Springer-Verlag.
- Houpt, K. A., Honig, S.U. & Reisner, I. R. (1996). Breaking the human–companion animal bond. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(10), 1653–1659.
- Irie, N., & Hasegawa, T. (2012). Summation by Asian Elephants (*Elephas maximus*). *Behavioral Sciences*, 2(2), 50–56. doi: 10.3390/bs2020050
- Kaminski, J., Call, J., Fischer, J. (2004). Word learning in a domestic dog: Evidence for "fast mapping". *Science*, 304(5677), 1682–1683. doi: 10.1126/science.1097859
- Karlsson, F. (2012). Critical anthropomorphism and animal ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 25(5), 707–720. doi: 10.1007/s10806-011-9349-8
- Kastak, C. R., & Schusterman, R. J. (2002). Sea lions and equivalence: expanding classes by exclusion. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 78(3), 449–465. doi:10.1901/jeab.2002.78-449
- Keeley, B. L. (2004). Anthropomorphism, primatomorphism, mammalomorphism: understanding cross-species comparisons. *Biology & Philosophy*, 19(4), 521–540. doi:10.1007/sbiph-004-0540-4
- Kennedy, J. S. (1992) *The New Anthropomorphism*. New York: Cambridge University Press.
- Kienzle, E., Bergler, R., & Mandernach, A. (1998). A comparison of the feeding behavior and the human–animal relationship in owners of normal and obese dogs. *The Journal of Nutrition*, 128(12), 2779S–2782S. doi: 10.1093/jn/128.12.2779s

- Kienzle, E., & Bergler, R. (2006). Human-animal relationship of owners of normal and overweight cats. *The Journal of Nutrition*, *136*(7), 1947S–1950S. doi: 10.1093/jn/136.7.1947s
- Kohda, M., Hotta, T., Takeyama, T., Awata, S., Tanaka, H., Asai, J., & Jordan, A. L. (2019). If a fish can pass the mark test, what are the implications for consciousness and self-awareness testing in animals? *PLOS Biology*, *17*(2), e3000021. doi: 10.1371/journal.pbio.3000021
- Konok, V., Nagy, K., & Miklósi, Á. (2015). How do humans represent the emotions of dogs? The resemblance between the human representation of the canine and the human affective space. *Applied Animal Behaviour Science*, *162*, 37–46. doi: 10.1016/j.applanim.2014.11.003
- Langford, D. J., Crager, S. E., Shehzad, Z., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Levenstadt, J. S., ... Mogil, J. S. (2006). Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science*, *312*(5782), 1967–1970. doi: 10.1126/science.1128322
- Leavens, D. A., & Hopkins, W. D. (1998). Intentional communication by chimpanzees: a cross-sectional study of the use of referential gestures. *Developmental psychology*, *34*(5), 813–822. doi:10.1037//0012-1649.34.5.813
- LeDoux, J. E. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, *73*(4), 653–676. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.004
- LeDoux, J. E. (2014). Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(8), 2871–2878. doi: 10.1073/pnas.1400335111
- LeDoux, J. E. (2015). *Anxious: Using the brain to understand and treat fear and anxiety*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E. (2017). Semantics, surplus meaning, and the science of fear. *Trends in Cognitive Sciences*, *21*(5), 303–306. doi: 10.1016/j.tics.2017.02.004
- LeDoux, J. E. (2019). *The Deep History of Ourselves: The Four-Billion-Year Story of How We Got Conscious Brains*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and anxiety: a two-system framework. *American Journal of Psychiatry*, *173*(11), 1083–1093. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.16030353

Capítulo 3

- LeDoux, J. E., & Brown, R. (2017). A higher-order theory of emotional consciousness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(10), E2016–E2025. doi: 10.1073/pnas.1619316114
- LeDoux, J. E., & Hofmann, S. G. (2018). The subjective experience of emotion: a fearful view. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *19*, 67–72. doi: 10.1016/j.cobeha.2017.09.011
- LeDoux, J. E., & Daw, N. D. (2018). Surviving threats: neural circuit and computational implications of a new taxonomy of defensive behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(5), 269–282. doi: 10.1038/nrn.2018.22
- Levine, E. (2009). Sound sensitivities. In: D. F. Horowitz, D. S. Mills (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine* (pp. 159-168). Gloucester: BSAVA.
- Lewis, M. (2014). *The rise of consciousness and the development of emotional life*. New York: Guilford Press.
- Lieberman, M. D. (2019). Boo! The consciousness problem in emotion. *Cognition and Emotion*, *33*(1), 24–30. doi: 10.1080/02699931.2018.1515726
- Lindsay, S. R. (2005). *Handbook of applied dog behavior and training, Volume 3*. Ames: Blackwell Publishing.
- Lurz, R. W. (2011). Belief attribution in animals: On how to move forward conceptually and empirically. *Review of Philosophy and Psychology*, *2*(1), 19–59. doi:10.1007/s13164-010-0042-z
- Macphail, E. M. (1982). *Brain and intelligence in vertebrates*. Oxford: Clarendon Press.
- Manteca, X. (2003). *Etología clínica veterinaria del perro y el gato*. Barcelona: Multimédica ediciones veterinarias.
- Martens, P., Enders-Slegers, M.-J., & Walker, J. K. (2016). The emotional lives of companion animals: Attachment and subjective claims by owners of cats and dogs. *Anthrozoös*, *29*(1), 73-88. doi: 10.1080/08927936.2015.1075299
- Mellor, D. J. (2016). Updating animal welfare thinking: Moving beyond the "five freedoms" towards "a life worth living". *Animals*, *6*(3), 21. doi:10.3390/ani6030021

- Michel, M., Beck, D., Block, N., Blumenfeld, H., Brown, R., Carmel, D., ... Yoshida, M. (2019). Opportunities and challenges for a maturing science of consciousness. *Nature Human Behaviour*, 3, 104-107. doi:10.1038/s41562-019-0531-8
- Miller, G. (2010). Is pharma running out of brainy ideas? *Science*, 329(5991), 502-504. doi: 10.1126/science.329.5991.502
- Mills, D. S. (2002). Learning, training and behaviour modification techniques. In: D. Horwitz, D. Mills, S. Heath (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine* (pp. 37-48). Gloucester: BSAVA.
- Mitchell, S. (2005). Anthropomorphism and cross-species modeling. In: L. Daston, G. Mitman (Ed.), *Thinking with Animals: New Perspectives on Anthropomorphism* (pp. 100-117). New York: Columbia University Press.
- Mobbs, D. (2018). The ethological deconstruction of fear(s). *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 24, 32-37. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.02.008
- Mobbs, D., Adolphs, R., Fanselow, M. S., Barrett, L. F., LeDoux, J. E., Ressler, K., & Tye, K. M. (2019). Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. *Nature Neuroscience*, 22(8), 1205-1216. doi: 10.1038/s41593-019-0456-6
- Morris, P. H., Doe, C., & Godsell, E. (2007). Secondary emotions in non-primate species? Behavioural reports and subjective claims by animal owners. *Cognition and Emotion*, 22(1), 3-20. doi: 10.1080/02699930701273716
- Osvath, M. (2009). Spontaneous planning for future stone throwing by a male chimpanzee. *Current Biology*, 19(5), R190-R191. doi: 10.1016/j.cub.2009.01.010
- Otovic, P., & Hutchinson, E. (2015). Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. *Altex*, 32(1), 41-50. doi:10.14573/altex.1406161
- Palestrini, C. (2009). Situational sensitivities. In: D. F. Horowitz, D. S. Mills (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine* (pp. 169- 181). Gloucester: BSAVA.
- Papineau, D., & Heyes, C. (2006). Rational or associative: Imitation in Japanese quail. In: S. Hurley, M. Nudds (Ed.), *Rational Animals?* (pp. 198-216). Oxford: Oxford University Press.

Capítulo 3

- Papini, M. R. (2008). *Comparative Psychology*. New York: Psychology Press.
- Penn, D. C., & Povinelli, D. J. (2007). On the lack of evidence that non-human animals possess anything remotely resembling a 'theory of mind'. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1480), 731–744. doi:10.1098/rstb.2006.2023
- Penn, D. C., Holyoak, K. J., & Povinelli, D. J. (2008). Darwins mistake: Explaining the discontinuity between human and nonhuman minds. *Behavioral and Brain Sciences*, 31(2), 109–178. doi: 10.1017/s0140525x08003543
- Penn, D. C., & Povinelli, D. J. (2013). The comparative delusion: The behavioristic/mentalistic dichotomy in comparative theory of mind research. In: J. Metcalfe, H. S. Terrace (Ed.), *Agency and joint attention* (pp. 62–78). New York: Oxford University Press.
- Perdue, B. M., Talbot, C. F., Stone, A. M., & Beran, M. J. (2012). Putting the elephant back in the herd: elephant relative quantity judgments match those of other species. *Animal Cognition*, 15(5), 955–961. doi:10.1007/s10071-012-0521-y
- Pfungst, O. (1965). *Clever Hans (the horse of Mr. Von Osten)*. New York: Holt, Rinehart and Winston.
- Pine, D. S., & LeDoux, J. E. (2017). Elevating the role of subjective experience in the clinic: response to Fanselow and Pennington. *American Journal of Psychiatry*, 174(11), 1121–1122. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17070818r
- Plotnik, J. M., de Waal, F. B., & Reiss, D. (2006). Self-recognition in an Asian elephant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(45), 17053–17057. doi: 10.1073/pnas.0608062103
- Polgár, Z., Blackwell, E. J., & Rooney, N. J. (2019). Assessing the welfare of kennelled dogs—A review of animal-based measures. *Applied Animal Behaviour Science*, 213, 1–13. doi: 10.1016/j.applanim.2019.02.013
- Povinelli, D. J. (1987). Monkeys, apes, mirrors and minds: The evolution of self-awareness in primates. *Human Evolution*, 2(6), 493–509.
- Povinelli, D. J. (2004). Behind the ape's appearance: escaping anthropocentrism in the study of other minds. *Daedalus*, 133(1), 29–41. doi: 10.1162/001152604772746675

- Povinelli, D. J., & Prince, C. G. (1998). When Self Met Other. In: M. Ferrari, R. J. Sternberg (Ed.), *Self-Awareness: Its nature and development* (pp. 37-107). New York: Guilford Press.
- Povinelli, D. J., Bering, J. M., Giambrone, S. (2000). Toward a science of other minds: escaping the argument by analogy. *Cognitive Science*, 24(3), 509–541. doi: 10.1016/s0364-0213(00)00023-9
- Premack, D. (2007). Human and animal cognition: Continuity and discontinuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), 13861–13867. doi: 10.1073/pnas.0706147104
- Preuss, T. M. (2011). The human brain: rewired and running hot. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1225(S1), E182-191. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06001.x
- Preuss T. M. (2012). Human brain evolution: from gene discovery to phenotype discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (Suppl 1), 10709–10716. doi:10.1073/pnas.1201894109
- Preuss, T. M., Cáceres, M., Oldham, M. C., & Geschwind, D. H. (2004). Human brain evolution: insights from microarrays. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), 850–860. doi: 10.1038/nrg1469
- Raby, C. R., Alexis, D. M., Dickinson, A., & Clayton, N. S. (2007). Planning for the future by western scrub-jays. *Nature*, 445(7130), 919–921. doi: 10.1038/nature05575
- Raby, C. R., & Clayton, N. S. (2009). Prospective cognition in animals. *Behavioural Processes*, 80(3), 314–324. doi: 10.1016/j.beproc.2008.12.005
- Ralph, C. R., & Tilbrook, A. J. (2016). INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *Journal of Animal Science*, 94(2), 457–470. doi: 10.2527/jas.2015-9645
- Range, F., Huber, L., & Heyes, C. (2011). Automatic imitation in dogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 278(1703), 211–217. doi:10.1098/rspb.2010.1142
- Reiss, D., & Marino, L. (2001). Mirror self-recognition in the bottlenose dolphin: A case of cognitive convergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5937–5942. doi: 10.1073/pnas.101086398

Capítulo 3

- Richards, C., Mottley, K., Pearce, J., & Heyes, C. (2009). Imitative pecking by budgerigars, *Melopsittacus undulatus*, over a 24 h delay. *Animal Behaviour*, *77*(5), 1111–1118. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.01.019
- Roberts, W. A., & Macpherson, K. (2011). Theory of mind in dogs: is the perspective-taking task a good test? *Learning & Behavior*, *39*(4), 303–305. doi: 10.3758/s13420-011-0037-3
- Romanes, G. J. (1882). *Animal Intelligence*. London: Kegan Paul, Trench & Co.
- Rooney, N., Gaines, S., & Hiby, E. (2009). A practitioner's guide to working dog welfare. *Journal of Veterinary Behavior*, *4*(3), 127–134. doi: 10.1016/j.jveb.2008.10.037
- Salas, M. (2017). *Assessment of welfare in captive wild ungulates* (PhD Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Serpell, J. A. (2003). Anthropomorphism and anthropomorphic selection—Beyond the "cute response". *Society & Animals*, *11*(1), 83–100. doi:10.1163/156853003321618864
- Sherwen, S. L., Magrath, M. J. L., Butler, K. L., & Hemsworth, P. H. (2015). Little penguins, *Eudyptula minor*, show increased avoidance, aggression and vigilance in response to zoo visitors. *Applied Animal Behaviour Science*, *168*, 71–76. doi: 10.1016/j.applanim.2015.04.007
- Shettleworth, S. J. (2009). The evolution of comparative cognition: Is the snark still a boojum? *Behavioural Processes*, *80*(3), 210–217. doi: 10.1016/j.beproc.2008.09.001
- Shettleworth, S. J. (2010a). *Cognition, Evolution and Behavior*. New York: Oxford University Press.
- Shettleworth, S. J. (2010b). Clever animals and killjoy explanations in comparative psychology. *Trends in Cognitive Sciences*, *14*(11), 477–481. doi: 10.1016/j.tics.2010.07.002
- Silva, K., & de Sousa, L. (2011). 'Canis empathicus'? A proposal on dogs' capacity to empathize with humans. *Biology letters*, *7*(4), 489–492. doi:10.1098/rsbl.2011.0083
- Sober, E. (2005). Comparative psychology meets evolutionary biology. Morgan's canon and cladistic parsimony. In: L. Daston, G. Mitman (Ed.), *Thinking with animals: New perspectives on anthropomorphism* (pp. 85–99). New York: Columbia University Press.

- Somel, M., Liu, X., & Khaitovich, P. (2013). Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*, 112-127. doi:10.1038/nrn3372
- Sousa, A. M. M., Zhu, Y., Raghanti, M. A., Kitchen, R. R., Onorati, M., Tebbenkamp, A. T. N., ... Sestan, N. (2017). Molecular and cellular reorganization of neural circuits in the human lineage. *Science*, *358*(6366), 1027-1032. doi: 10.1126/science.aan3456
- Suddendorf, T., & Corballis, M. C. (2010). Behavioural evidence for mental time travel in nonhuman animals. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 292-298. doi: 10.1016/j.bbr.2009.11.044
- Suddendorf, T., & Butler, D. L. (2013). The nature of visual self-recognition. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(3), 121-127. doi: 10.1016/j.tics.2013.01.004
- Suddendorf, T., & Butler, D. L. (2014). Response to Gallup et al.: are rich interpretations of visual self-recognition a bit too rich? *Trends in Cognitive Sciences*, *18*(2), 58-59. doi: 10.1016/j.tics.2013.11.004
- Sutton, J. E., & Shettleworth, S. J. (2008). Memory without awareness: Pigeons do not show metamemory in delayed matching to sample. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *34*(2), 266-282. doi:10.1037/0097-7403.34.2.266
- Teffer, K., & Semendeferi, K. (2012). Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Progress in Brain Research*, (195), 191-218. doi: 10.1016/b978-0-444-53860-4.00009-x
- Thornton, A., & McAuliffe, K. (2006). Teaching in wild meerkats. *Science*, *313*(5784), 227-229. doi: 10.1126/science.1128727
- Tinbergen, N. (1951). *The Study of Instinct*. New York: Oxford University Press.
- Todd, Z. (2018). Barriers to the adoption of humane dog training methods. *Journal of Veterinary Behavior*, *25*, 28-34. doi: 10.1016/j.jveb.2018.03.004
- Tulving, E. (2005). Episodic memory and autonoesis: Uniquely human? In: H. S. Terrace, J. Metcalfe (Ed.), *The missing link in cognition: Origins of self-reflective consciousness* (pp. 3-56). New York: Oxford University Press.

Capítulo 3

- Udell, M. A. R., Dorey, N. R., & Wynne, C. D. L. (2010). What did domestication do to dogs? A new account of dogs' sensitivity to human actions. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *85*(2), 327–345. doi:10.1111/j.1469-185x.2009.00104.x
- Udell, M. A. R., & Wynne, C. D. L. (2011). Reevaluating canine perspective-taking behavior. *Learning & Behavior*, *39*(4), 318–323. doi: 10.3758/s13420-011-0043-5
- Urquiza-Haas, E. G. & Kotrschal, K. (2015). The mind behind anthropomorphic thinking: attribution of mental states to other species. *Animal Behaviour*, *109*, 167–176. doi:10.1016/j.anbehav.2015.08.011
- Vasconcelos, M., Hollis, K., Nowbahari, E., & Kacelnik, A. (2012). Pro-sociality without empathy. *Biology Letters*, *8*(6), 910–912. doi: 10.1098/rsbl.2012.0554
- Voelkl, B., & Huber, L. (2000). True imitation in marmosets. *Animal Behaviour*, *60*(2), 195–202. doi: 10.1006/anbe.2000.1457
- Voith, & V.L., Borchelt, P.L. (1996). *Readings in Companion Animal Behavior*. Trenton: Veterinary Learning Systems.
- Werning, M. (2010). Descartes discarded? Introspective self-awareness and the problems of transparency and compositionality. *Consciousness and Cognition*, *19*(3), 751–761. doi: 10.1016/j.concog.2010.07.003
- Whiten, A. (2013). Humans are not alone in computing how others see the world. *Animal Behaviour*, *86*(2), 213–221. doi: 10.1016/j.anbehav.2013.04.021
- Whiten, A., & Byrne, R. W. (1988). Tactical deception in primates. *Behavioral and Brain Sciences*, *11*(2), 233–244. doi: 10.1017/s0140525x00049682
- Whiten, A., Horner, V., Litchfield, C. A., & Marshall-Pescini, S. (2004). How do apes ape? *Animal Learning & Behavior*, *32*(1), 36–52. doi: 10.3758/bf03196005
- Woo, C.-W., Schmidt, L., Krishnan, A., Jepma, M., Roy, M., Lindquist, M. A., ... Wager, T. D. (2017). Quantifying cerebral contributions to pain beyond nociception. *Nature Communications*, *8*, 14211. doi: 10.1038/ncomms14211

- Wynne, C. D. L. (2004). The perils of anthropomorphism. *Nature*, 428(6983), 606. doi: 10.1038/428606a
- Wynne, C. D. L. (2007a). Anthropomorphism and its discontents. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, 2, 151-154. doi: 10.3819/ccbr.2008.20013
- Wynne, C. D. L. (2007b). What are Animals? Why anthropomorphism is still not a scientific approach to behavior. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, 2, 125-135. doi:10.3819/ccbr.2008.20008
- Zentall, T. R., Wasserman, E. A., Lazareva, O. F., Thompson, R. K. R., & Rattermann, M. J. (2008). Concept learning in animals. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, 3, 13-45. doi:10.3819/ccbr.2008.30002
- Ziv, G. (2017). The effects of using aversive training methods in dogs—A review. *Journal of Veterinary Behavior*, 19, 50-60. doi: 10.1016/j.jveb.2017.02.004

DISCUSIÓN GENERAL

1. PARÁMETROS DE COMPORTAMIENTO, MIEDO Y ANSIEDAD

1.1. Complicaciones asociadas a la poca consistencia en la terminología empleada

La evaluación de la conducta proporciona una herramienta no invasiva para la valoración del estrés. Dentro de los contextos defensivos, desde el nivel más simple se pueden utilizar los comportamientos de aproximación y evitación, así como las reacciones de congelación, huida o ataque y la expresión de vocalizaciones (Paul et al., 2005). Aparte de estos, se han sugerido algunos comportamientos que serían más específicos de los perros – de los que hablaremos con más detalle a continuación – como levantar la pata, el *lip licking*, evitar la mirada directa, el jadeo, los gemidos, el grooming y las sacudidas del cuerpo, entre otros. No obstante, la medición del comportamiento es difícil y crear medidas comportamentales predictivas todavía más (Overall, 2014d). Centrándonos en los perros, que es la especie sobre la que hemos realizado estas valoraciones en nuestro caso, Diederich y Giffroy apuntan a una sustancial falta de consenso en los parámetros que se utilizan para valorar su conducta. Además, las pruebas que se emplean para ello son con frecuencia particulares de cada investigador (Diederich and Giffroy, 2006), con lo cual, hay una absoluta falta de estandarización. Por otra parte, no es raro encontrar agrupaciones de comportamientos en los diferentes estudios – incluidos los nuestros – con el objetivo, entre otros, de facilitar el análisis. Sin embargo, esta decisión no siempre ayudará a trasladar la información que se obtenga de forma aplicada. Por poner un ejemplo concreto, las vocalizaciones se suelen incluir dentro de los parámetros conductuales que se evalúan y encontramos tanto artículos en los que se agrupan (Palmer and Custance, 2008) como otros en los que las valoran por separado (Palestrini et al., 2010; Scaglia et al., 2013). Esto puede ser un problema cuando incluso dentro de un mismo tipo de vocalización, como el ladrido, puede haber diferentes connotaciones (Cohen and Fox, 1976; Pongrácz et al., 2010). En este aspecto, Overall recalca que sin etogramas detallados es fácil acabar generando suposiciones engañosas sobre los mecanismos subyacentes a los comportamientos que observamos (Overall, 2014b). De hecho, en un intento reciente de poner orden a este caos, la investigadora pidió la colaboración en un proyecto global con el objetivo de acordar un conjunto estandarizado de descripciones para utilizar en el campo del comportamiento (Overall, 2014a). Otro esfuerzo notable vino de la mano de Jones y Gosling, quienes propusieron siete categorías de descriptores de temperamento canino tras una revisión de la literatura existente (Jones and Gosling, 2005). Cabe mencionar que los autores eliminaron términos indicativos de las motivaciones internas o de los estados emocionales. Este matiz a la hora de evitar sesgos en los descriptores de comportamiento es importante, como se argumentará con más detalle en otro apartado de la discusión general.

1.2. El uso confuso de las palabras miedo y ansiedad

Actualmente no hay un consenso semántico con respecto a las palabras miedo y ansiedad y con frecuencia siguen utilizándose indistintamente o incluso se combinan (LeDoux and Pine, 2016; Mobbs, 2018). Aun siendo conceptos entrelazados es necesario desemparejarlos, pues existen diferencias neuronales, farmacológicas, conductuales y clínicas que conviene tener en cuenta (McNaughton and Corr, 2004). Por un lado, encontramos desemejanzas a nivel de expresión comportamental. En este marco, McNaughton y Corr en su modelo asocian el *freezing* con las situaciones de amenaza inevitable y la inhibición de comportamiento con las evitables. Dicho de otro modo, el *freezing* estaría más bien relacionado con lo que se entiende por miedo y la inhibición conductual con la ansiedad. Por otro lado, los mecanismos cerebrales que se activan son en parte diferentes (LeDoux, 2015). En concreto, el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) parece desempeñar un rol principal en situaciones que implican incertidumbre o amenazas inciertas, frente a la amígdala, que tendría un papel protagonista en el procesamiento de las amenazas específicas (Walker et al., 2009; Davis et al., 2010; Hammack et al., 2015). Otra importante distinción se detecta a nivel farmacológico. En este sentido, la inhibición del comportamiento parece distinguirse de la congelación por ser sensible a los fármacos ansiolíticos (Gray and McNaughton, 2000). Esto se ha investigado en una amplia gama de especies, incluidos los invertebrados. Por ejemplo, en un estudio en el que utilizaron clordiazepóxido en cangrejos de río se redujo la inhibición de comportamiento que mostraron los animales tras haber recibido una descarga eléctrica en un lugar concreto, de forma similar a lo que les ocurre a los roedores cuando se aplica el paradigma del laberinto elevado en cruz (Fossat et al., 2014). Por otra parte, y sin entrar en detalle, estas diferencias entre los términos miedo y ansiedad también se reflejan a nivel de la psicopatología y de las configuraciones experimentales para evaluar cada uno de ellos (Hagenaars, 2014).

1.3. Variabilidad en los parámetros de comportamiento utilizados

De forma específica, la mayoría de los artículos revisados de nuestro campo no hacían mención de esta problemática asociada al uso inconsistente de las palabras miedo y ansiedad. Con todo, encontramos varios que sí lo advertían parcialmente (Blackwell et al., 2013; Gruen et al., 2015). Concretamente, los autores del primero indican que ambos términos están definidos de forma muy variable en la literatura. Por su parte, los del segundo señalan que a menudo se usan indistintamente para describir una constelación de respuestas conductuales y fisiológicas. A este respecto, se han

propuesto numerosos signos comportamentales de supuesta expresión de ansiedad. Desde el *freezing* y la inmovilidad tónica al incremento de la deambulación, así como el jadeo, la irritabilidad y la inquietud, la tensión muscular, determinadas “expresiones faciales de ansiedad”, la micción y defecación, la agresividad y los comportamientos de vigilancia, entre otros (Ohl et al., 2008). De forma similar, otros estudios incluyen algunos de estos comportamientos citados como parte del repertorio de signos de ansiedad y, a su vez, añaden otros, como el *lip licking*, los bostezos y las vocalizaciones (Palestrini et al., 2010; Scaglia et al., 2013). En este aspecto, cabe advertir que fue prácticamente imposible encontrar una coincidencia absoluta en ninguno de los artículos revisados. Todos incluían algunos de estos comportamientos mencionados y omitían otros tantos. Aun así, como adelantábamos, el problema no está únicamente en esta variabilidad en los parámetros comportamentales analizados, sino que también existe una notable diversidad en cuanto a los términos utilizados para englobar estas variables. Encontramos desde artículos en los que los contienen dentro del miedo y la ansiedad prácticamente sin distinción (Dreschel, 2010; Blackwell et al., 2013; Landsberg et al., 2015; van Rooy et al., 2018; Polgár et al., 2019), a aquellos en los que solo mencionan el miedo (Stellato et al. 2017), los comportamientos relacionados con el miedo (Levine et al., 2007), o los signos de ansiedad (Scaglia et al., 2013; Overall et al., 2016). Además de otros en los que se habla de un estado emocional negativo (Masson et al., 2018), de estrés y/o ansiedad (Pastore et al., 2011) y de estrés (Siniscalchi et al., 2013), entre otros términos que se emplean.

Tampoco facilita el trabajo el hecho de que algunas de las conductas que se usan para categorizar el miedo y la ansiedad se manejen igualmente para referirse a comportamientos en otros contextos. Por ejemplo, el *lip licking*, los bostezos o el levantar una de las patas, entre otras, se utilizan en ocasiones como medidas de miedo y ansiedad (Landsberg et al., 2015) o como “conductas sutiles de miedo” (Stellato et al., 2017). No obstante, las encontramos igualmente dentro del concepto global de conductas de desplazamiento (Lund and Jørgensen, 1999; Kuhne et al., 2012; van Rooy et al., 2018), o incluso en otros contextos como señales de apaciguamiento (Pastore et al., 2011) o señales de calma (Rugaas, 2006). Específicamente, las señales de apaciguamiento a menudo son vistas como posturas y actitudes que los perros muestran hacia sus conespecíficos en situaciones de posible conflicto social (Pastore et al., 2011). Por su parte, Beerda y colaboradores conciben estas respuestas conductuales como indicativas de estrés (Beerda et al., 1997), incluso en situaciones no sociales (Beerda et al., 1998). Sin embargo, otros sugieren que el *lip licking*, por ejemplo, podría constituir una señal comunicativa que no necesariamente se relaciona con situaciones estresantes (Rehn and Keeling, 2011). Como vemos, queda todavía un amplio recorrido para alcanzar ese conjunto estandarizado de descripciones en nuestro campo del que hablábamos previamente.

1.4. El *freezing* como ejemplo de las consecuencias de esta falta de consenso

Si nos centramos en el *freezing* o congelación – una de las respuestas defensivas más estudiadas en la ciencia del comportamiento – encontramos diferentes términos para hacer referencia a este concepto, como la inmovilidad atenta, inmovilidad hiperreactiva o inmovilidad reactiva (Kozłowska et al., 2015). No obstante, también hallamos múltiples definiciones del *freezing* que varían ligeramente entre los artículos:

- “Supresión de todo movimiento exceptuando el requerido para la respiración” (Fanselow and Bolles, 1979; Nader et al., 2001; Anagnostaras, 2010).
- “Estado de inmovilidad de alerta” (Blanchard and Blanchard, 1989).
- “Una inhibición del movimiento, como una estatua” (Lang and Davis, 2006).
- “Ausencia total de movimiento, excepto la asociada con la respiración y una postura corporal tensa” (Hagenaars et al., 2014; Roelofs, 2017).

Estas sutilezas son importantes, pues pueden llevar a conclusiones confusas y a dar un mayor peso a comportamientos distintos según la definición empleada. En el caso de la presente tesis, observamos las consecuencias que pueden derivarse de estos matices diferenciales en las definiciones del *freezing*. Concretamente, en nuestro estudio piloto del Capítulo 1 empleamos una definición tan amplia que es probable que esta abarcara comportamientos que realmente no constituían *freezing*. En este sentido, la definición por la que optamos en el segundo estudio – que incluía el matiz de la postura corporal tensa – cambió la frecuencia de observación hasta el punto de que la congelación fue detectada de forma residual durante los periodos en los que no se aplicaba el sonido aversivo, apareciendo de forma mucho más intensa cuando se presentaba el estímulo sonoro. Otro ejemplo de la confusión que puede generarse en función de las definiciones que se usen lo encontramos en el estudio de Stellato y colaboradores. En este trabajo no hallaron una relación significativa para ninguna de las pruebas (sociales y no sociales) entre lo que ellos valoraron como conducta de *freezing* y lo que denominaron comportamientos sutiles de miedo (*lip licking*, levantar la pata, bostezar y determinadas vocalizaciones, entre otras) (Stellato et al., 2017). Teniendo en cuenta que estos comportamientos sutiles se correlacionaron con lo que ellos consideraron que eran indicadores de miedo, acabaron incluso cuestionando si la congelación era indicativa de ello. Hay que decir que también se plantearon que tal vez la inactividad que valoraron significaba más bien un cese de comportamiento asociado a la vigilancia, en lugar de congelación. En relación con esto, cabe matizar que el *freezing* se considera una respuesta innata, universal (LeDoux, 2015; Hagenaars et al., 2014; Roelofs, 2017) y que forma parte del repertorio de respuestas de defensa específicas de especie. Es

decir, al igual que la huida y la lucha, es una reacción defensiva que se desencadena de forma automática por estímulos externos y que se expresa de forma muy similar en todos los miembros de una especie (LeDoux, 2015). En este aspecto, se ha visto que el mismo patrón de reacción defensiva se observa tanto en ratas silvestres como en ratas criadas en laboratorio (Blanchard et al., 1986), lo que indica que no es necesaria la experiencia previa para mostrar estas respuestas. Sin embargo, sí se han detectado variaciones en cuanto a la expresión diferencial de cada una de estas reacciones, reduciéndose notablemente el ataque y siendo el *freezing* el componente principal en las ratas de laboratorio (Blanchard et al., 1991). Esto contrasta con las llamadas acciones defensivas. En este caso, los animales pueden mostrar diferentes comportamientos para evitar una situación o salir de ella en función de las condiciones en las que se encuentren (ya sea corriendo, nadando, saltando, volando o presionando una palanca). Por tanto, estas respuestas defensivas no serían específicas de especie como la congelación, sino que constituirían acciones motoras que mediante el aprendizaje se pueden utilizar para escapar o evitar una situación (LeDoux, 2015).

Por último, conviene señalar que el *freezing* no es la única respuesta de inmovilidad asociada a un contexto de amenaza. Hay otros comportamientos que se caracterizan también por esta ausencia de movilidad, como la orientación hacia el estímulo, la inhibición comportamental relacionada con la evaluación de riesgos y la inmovilidad tónica (Hagenaars et al., 2014; Roelofs, 2017). Con respecto a la orientación, esta se acompaña frecuentemente de una reducción del movimiento y la atención se dirige a un nuevo estímulo del entorno. Por tanto, en cierta medida la congelación y la orientación comparten ese componente de inmovilidad atenta (Roelofs, 2017). Por su parte, en el Capítulo 1 ya se comentaron con cierto detalle las diferencias entre el *freezing* y la inhibición de comportamiento. En cuanto a la inmovilidad tónica, esta suele ocurrir más tarde dentro de la cascada defensiva. Aunque sus características físicas todavía no están completamente claras, se diferencia del *freezing* en la ausencia de respuesta, pues la congelación prepara activamente al animal para otras respuestas defensivas. De hecho, la congelación podría considerarse de algún modo una respuesta de lucha o huida suspendida (Kozłowska et al., 2015). En tal sentido, la sustancia gris periacueductal actúa como freno inhibiendo el componente fásico de la función motora, pero no el tónico. De esta manera, el tono muscular es alto aunque el animal muestre inhibición de la respuesta motora, característico del *freezing* (Roelofs, 2017). Esta cuestión representaría una de las diferencias de la congelación con respecto a otros tipos de inmovilidad.

En definitiva, y concluyendo este apartado, la ciencia del comportamiento y la etología clínica sufren una importante falta de estandarización, en buena medida debido a las definiciones tan variables que se manejan (Overall, 2017).

2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DEL EJE HPA ASOCIADOS A ESTRÉS

2.1. Parámetros fisiológicos asociados al estrés

En los últimos años se ha incrementado el interés por el bienestar de los animales de compañía, cuestionándose determinadas condiciones de alojamiento o de manejo que estaban totalmente aceptadas en el pasado (Beerda et al., 1997). Por tanto, se ha generado la necesidad de una evaluación objetiva del estrés en el contexto doméstico. En el apartado anterior hemos discutido los parámetros de comportamiento asociados a estrés. Debido a que estas medidas por sí solas pueden ser ambiguas o inespecíficas, lo ideal es combinarlas con valoraciones fisiológicas que permitan un análisis más claro de los resultados. En este sentido, tal como desarrollamos en la introducción de esta tesis, la exposición a estímulos estresantes conlleva la activación de dos sistemas neuroendocrinos: el eje hipotalámico-simpático-adrenomedular y el eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) (Romero and Butler, 2007; Habib et al., 2001). De forma específica, cabe recordar que la respuesta de estrés se activa también en situaciones defensivas. Es decir, tanto el sistema simpático-adrenal como el pituitario-adrenal responden al procesamiento de amenazas en la amígdala (Rodrigues et al., 2009), proporcionando el soporte fisiológico necesario. Concretamente el núcleo central de la amígdala controla las respuestas de comportamiento – como la congelación – y los cambios mediados por el sistema nervioso autónomo y las respuestas hormonales, en especial la liberación de adrenalina, noradrenalina y cortisol (LeDoux, 1996; Kalin et al., 2004).

Entre los parámetros fisiológicos que se han utilizado para valorar el estrés se incluyen diferentes medidas hormonales (catecolaminas, glucocorticoides, prolactina, vasopresina y oxitocina, entre otras), medidas de frecuencia cardíaca y de presión arterial, la determinación de la temperatura corporal, proteínas de fase aguda e indicadores inmunológicos. Centrándonos en la especie canina, en una serie de estudios en los que valoraron tanto el estrés agudo como el crónico, Beerda y colaboradores propusieron como medidas fisiológicas la frecuencia cardíaca, las catecolaminas, el cortisol en plasma y orina y el estado inmunitario (Beerda et al., 1997, 1998, 1999, 2000). Sin embargo, algunos de estos parámetros propuestos presentan el inconveniente de verse afectados por los procedimientos para tomar las muestras (Beerda et al., 1997), lo que complica la interpretación de los resultados. Por otra parte, en un estudio reciente se evaluó la potencialidad de la termografía infrarroja como método no invasivo en el estudio del estrés en perros que acudían al veterinario, sugiriendo sus resultados que podría ser una herramienta útil (Travain et al., 2015). Con todo, al igual

que ocurre en la valoración de muchas otras variables, los perros mostraron ciertas conductas de evitación al emplear esta metodología. En este sentido, a modo de recomendación general, convendría que los animales estuvieran previamente entrenados para la recolección de las muestras y la manipulación física asociada.

2.2. Utilización del cortisol como parámetro fisiológico representativo del eje HPA

Actualmente, el indicador fisiológico que más se emplea para valorar la respuesta de estrés es la concentración de glucocorticoides como representación de la activación del eje HPA (principalmente cortisol en perro y gato). La determinación de los niveles de cortisol en estas dos especies ha sido ampliamente utilizada en diferentes matrices: plasma (Hennessy et al., 1997; Hennessy et al., 2001; Bergeron et al., 2002; Hydbring-Sandberg et al., 2004; Rosado et al., 2010), saliva (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1998; Beerda et al., 1999; Bergeron et al., 2002; Dreschel and Granger, 2005), orina (Beerda et al., 1999; Blackwell et al., 2010), heces (Schatz and Palme, 2001; Accorsi et al., 2008) y pelo (Accorsi et al., 2008; Siniscalchi et al., 2013; Roth et al., 2016). De todas formas, cabe decir que las relaciones entre el comportamiento inducido por estrés y las concentraciones del cortisol siguen sin estar claras (Rooney et al., 2007). Es posible que la alta variabilidad comportamental – sobre la que hemos discutido ampliamente a lo largo de esta tesis – pueda deslucir esta relación entre los niveles hormonales y los parámetros conductuales.

Nosotros decidimos emplear el análisis de los niveles de cortisol en pelo en base a una serie de ventajas que presenta con respecto a otras matrices. Entre estas ventajas encontramos las condiciones sencillas de almacenamiento y conservación, la recolección no especialmente invasiva de las muestras en comparación con las mediciones de cortisol sérico y salival y su capacidad de representar un valor de la actividad adrenal a largo plazo (Talló, 2016), lo cual va unido al hecho de poder reducir el esfuerzo de tomar muestras repetidas (Bryan et al., 2013).

En nuestro caso particular encontramos una tendencia ($P = 0.05$) con respecto a las diferencias en los niveles de cortisol en pelo en el estudio del Capítulo 2, siendo dichos niveles superiores en el grupo de gatos que mostraban cambios de comportamiento relacionados con el estrés. Sin embargo, los valores por individuo se conservaron en gran medida. Con lo cual, no parece que pueda aprovecharse esta metodología para analizar el éxito de las intervenciones habitualmente utilizadas. En relación con esto, Beerda y colaboradores señalan la dificultad en la interpretación de las mediciones de estrés en condiciones no experimentales debido a la alta variabilidad y a la gran

cantidad de factores no controlados (Beerda et al., 1998). Por su parte, en el estudio del Capítulo 1 sobre el efecto de la predictibilidad tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de cortisol entre los dos grupos experimentales. En este sentido, ya se apuntó en dicho capítulo a las limitaciones metodológicas que pudieron complicar el análisis.

Cabe añadir que al analizar la respuesta de estrés se recomienda considerar también, más allá de la magnitud de la propia respuesta, la velocidad de recuperación (Linden et al., 1997). En el caso de nuestro estudio piloto sobre el efecto de la predictibilidad utilizamos tres fases. La valoración previa a la presentación del sonido podría considerarse una fase anticipatoria. Y la fase posterior a la aparición del estímulo aversivo, la de recuperación. Además, durante la exposición al sonido se evaluaba la reactividad al mismo. No obstante, nosotros únicamente tomamos dos muestras, una justo antes de empezar la fase experimental y otra al final. Por tanto, en futuros diseños se podría plantear un análisis más detallado del transcurso de la actividad de ambos sistemas (simpático-adrenal y pituitario-adrenal) a lo largo de las diferentes fases.

2.3. Interrogantes pendientes y direcciones futuras

A pesar de que el uso de esta metodología está creciendo de forma sustancial en los últimos años, quedan algunas cuestiones por desentrañar. Por ejemplo, todavía es necesario aclarar el mecanismo de incorporación del cortisol en el pelo (Stalder and Kirschbaum, 2012). Igualmente se requiere información más específica sobre el grado en que esta hormona varía a lo largo del tallo del pelo (Russell et al., 2012). Por otra parte, tal como desarrollamos en el Capítulo 2, el efecto de factores como el sexo, la edad y las influencias estacionales en el contenido de cortisol en esta matriz requiere una mayor investigación. En nuestro estudio de dicho capítulo no se halló una influencia del sexo ($P = 0.56$), la edad ($P = 0.74$), u otras variables ambientales, como la presencia de gatos ($P = 0.51$) o perros ($P = 0.53$) en la casa y la posibilidad de acceder al exterior ($P = 0.13$), sobre las concentraciones de cortisol en pelo. Una revisión de la bibliografía sobre este tema arrojó resultados inconsistentes, encontrándose estudios coincidentes con el nuestro y otros que no. En cualquier caso, se recomienda estandarizar todo lo posible los parámetros individuales, ambientales y de manejo – que constituyen posibles factores de confusión – en los protocolos de muestreo (Heimbürge et al., 2019). Por otro lado, la posible influencia estacional en los niveles hormonales no fue considerada en nuestros estudios. No obstante, el hecho de que encontremos trabajos en los que sí se detectó dicha influencia (Roth et al., 2016) hace que sea conveniente tenerlo en cuenta. Por último, también se han hallado

resultados contradictorios en cuanto al efecto del color del pelo en las concentraciones de cortisol, así como con respecto a la localización anatómica de muestreo. En los estudios de los Capítulos 1 y 2 decidimos estandarizarlo para todos los individuos, escogiendo la zona cervical en el caso de los perros y la cara externa del muslo en los gatos. Por su parte, el color del pelo tuvo una influencia significativa ($P < 0,0001$) en el estudio del Capítulo 2, lo cual sugiere que es necesario considerarlo al emplear esta metodología, aunque actualmente se desconocen las causas que subyacen a esta posible relación.

En otro orden de ideas, se ha sugerido que el estrés crónico puede ser difícil de evaluar con los niveles de glucocorticoides (Hennessy, 2013). Además, se advierte que las matrices como el pelo reflejan una respuesta acumulativa que es consecuencia de una serie de exposiciones inespecíficas (Liu and Doan, 2019). A este respecto, Liu y Doan (2019) remarcan también la idea de que el análisis del cortisol en las matrices acumulativas se produce dentro de un sistema dinámico que puede llegar en ocasiones a habituarse. Cabe subrayar que en nuestros estudios los animales pudieron verse expuestos a situaciones que alteraran en mayor o menor medida el eje HPA. Esto pudo afectar de forma más marcada en el caso del estudio del Capítulo 2, pues cada uno de los gatos vivía en un ambiente de diferente complejidad física y social. En contraste, los beagles de nuestros estudios sobre el efecto de la predictibilidad compartían el mismo entorno. Esta cuestión, unida a la complejidad de la fisiología del estrés y la variabilidad individual, enfatiza todavía más la importancia de valorar múltiples parámetros. Enfocado al campo del bienestar animal, Dawkins hace hincapié en el hecho de que no existe una medida única de bienestar y recomienda la utilización de diferentes tipos de mediciones (salud, comportamiento y fisiología) (Dawkins, 2006). En esta misma línea, en un reciente metaanálisis sobre la utilización del cortisol en pelo en humanos recomendaron complementar las evaluaciones hormonales en esta matriz con medidas adicionales del funcionamiento del eje HPA. Como señalan los autores, la valoración del cortisol en pelo representa la captura de un aspecto concreto de la actividad endocrina, por lo que aconsejan emplearla como estrategia complementaria dentro de un enfoque que incluya múltiples metodologías (Stalder et al., 2017). Esto adquiere todavía más relevancia si tenemos en cuenta que el incremento de los niveles de cortisol puede estar relacionado con situaciones no perjudiciales para el bienestar del individuo (Rushen, 1991; Broom and Johnson, 1993; Lay, 2010; Otovic and Hutchinson, 2015). Con todo, hay que decir que es probable que muchos otros parámetros fisiológicos reflejen principalmente excitación, lo cual complica la discriminación del valor de ese estado de excitación (Paul et al., 2005), que será diferente en un contexto defensivo con respecto a uno sexual, de caza o de juego. Relacionado con esto, adelantábamos en la introducción de la tesis que la amígdala también procesa estímulos apetitivos

(Holland and Gallagher, 1999). Por ejemplo, se ha observado la implicación de esta estructura en comportamientos maternos, sexuales y los relacionados con la ingesta (LeDoux, 2012b).

En definitiva, teniendo en cuenta lo expuesto, en futuros diseños experimentales que compartan los objetivos planteados en esta tesis podría proponerse la utilización de otros parámetros, como las medidas repetidas de cortisol fecal o salival a lo largo del estudio.

3. RELACIÓN DEL ESTRÉS Y LOS PROBLEMAS DE COMPORTAMIENTO & LIMITACIONES Y DIRECCIONES FUTURAS EN LAS INTERVENCIONES

3.1. Relación del estrés y los problemas de comportamiento

Los animales domésticos están expuestos a un entorno que puede ser desafiante, representando el ambiente estructural y el social las principales fuentes de estrés. Comentamos en el Capítulo 2 que los gatos son particularmente vulnerables a los cambios en el entorno, a los ambientes empobrecidos y a las alteraciones en cuanto a las relaciones sociales con las personas y otros animales (Amat et al., 2016). En relación con esto, el estudio de los problemas de comportamiento en los que está implicado el estrés es fundamental. Entre otras cosas porque, tal y como desarrollamos con más detalle en la introducción de la tesis, el estrés puede contribuir al desarrollo de diferentes enfermedades (Enck, 1992; Virga, 2003; Cameron et al., 2004; Buffington et al., 2006; Defauw et al., 2011; Tanaka et al., 2012). Además, los problemas de comportamiento constituyen un riesgo para el vínculo humano-animal y representan una causa frecuente de abandono y eutanasia (Edney, 1998; Salman et al., 2000). Por tales motivos, es necesario disponer de indicadores adecuados para evaluar de forma científica el impacto del estrés en las especies domésticas con las que convivimos, así como para valorar su evolución durante la aplicación de los protocolos de tratamiento. En este sentido, hoy por hoy únicamente se puede estimar de forma indirecta a través de ciertos indicadores de comportamiento y de la valoración subjetiva del propietario. A este respecto, el Capítulo 2 de la tesis abordó la hipótesis sobre si los niveles de cortisol en pelo se reducían significativamente con las estrategias terapéuticas aplicadas en un grupo de gatos con problemas relacionados con el estrés. En nuestro caso no se obtuvieron resultados que sugiriesen que la valoración de dichos niveles fuera un método adecuado para analizar el éxito de estas estrategias. Referente a esto, en el segundo apartado de esta discusión se han expuesto algunas de las razones que pueden explicar estos resultados.

Por otra parte, muchas de las situaciones estresantes que pueden afectar a los animales domésticos están relacionadas con eventos impredecibles que además no pueden controlar (Wiepkema and Koolhaas, 1993). A menudo se enfrentan a cambios en el grupo social y en el entorno físico (Ohl et al., 2008), así como a alteraciones de las rutinas y a la inconsistencia del manejo de los propietarios (Luescher and Reisner, 2008; Arhant et al., 2010; Amat et al., 2016). Desde esta perspectiva, encontramos varios ejemplos de problemas de comportamiento en los que la imprevisibilidad y la ausencia de controlabilidad pueden jugar un papel fundamental, como es el caso de los problemas relacionados con la separación (Amat et al., 2014) y el de la reactividad hacia ruidos fuertes del tipo fuegos artificiales y tormentas (Blackwell et al., 2013). Con el objetivo de encarar esta cuestión, en el Capítulo 1 analizamos si el hecho de establecer predictibilidad conseguía reducir el efecto estresante de un estímulo aversivo aplicado en perros de raza beagle. Contrariamente a nuestras expectativas, no se pudo demostrar de forma clara esta cuestión, en parte debido a una serie de limitaciones metodológicas que pudieron diluir la posible influencia de esta variable. También cabe señalar que en nuestros estudios los animales no disponían de opciones para dar respuestas activas durante el estímulo aversivo que les permitiera escapar o evitarlo de algún modo. En relación con esto, en un trabajo realizado en gatos que vivían en un entorno de laboratorio y que fueron sometidos a condiciones diferentes de predictibilidad, encontraron que los animales que se escondían más tendían a tener niveles de cortisol más bajos. A su vez, este comportamiento se incrementaba en situaciones de estrés. Con lo cual, sus resultados sugerían que la acción de esconderse podía ser importante para hacer frente a entornos cautivos de poco control y previsibilidad (Carlstead et al., 1993). En este aspecto, en los últimos años ha habido un creciente interés con respecto a las estrategias de afrontamiento activas como parte de las intervenciones en los problemas relacionados con el estrés (Cain and LeDoux, 2007; Boeke et al., 2017). Teniendo en cuenta esto, en futuros diseños se podría plantear la posibilidad de analizar los efectos del control y la predictibilidad por separado y en combinación utilizando varios grupos experimentales.

3.2. Experiencias tempranas y alteraciones de la conducta

En el Capítulo 1 se consideró el efecto de los periodos sensibles en las respuestas defensivas. En este sentido, se sabe que los comportamientos defensivos cambian a lo largo del desarrollo (Wiedenmayer, 2009), adquiriendo especial relevancia la ontogenia temprana. De hecho, los déficits de exposición a determinados estímulos durante estos periodos pueden estar detrás de numerosos

problemas de comportamiento en los animales domésticos (Manteca, 2003; Beaver, 2009). En este marco, el tipo de plasticidad más relevante durante los periodos sensibles es la expectante de experiencia (Greenough et al., 1987; Kolb et al., 2013). Esta es necesaria para la formación y estabilización de las conexiones sinápticas y de los circuitos cerebrales en base a un conjunto de experiencias esperables en determinados periodos del desarrollo de una especie (Greenough et al., 1987). Por ejemplo, entre los trabajos clásicos sobre esta cuestión destacan los que realizaron Wiesel y Hubel en gatos con relación al desarrollo de las áreas visuales de la corteza cerebral (Wiesel and Hubel, 1963). Estos investigadores encontraron que los animales privados de visión en etapas tempranas mostraban después una contracción de las columnas de dominancia relacionadas con el ojo cerrado y a favor de una fuerte dominancia por parte del que permaneció abierto. Esto es, se producía un desarrollo desigual de las columnas de dominancia ocular como resultado de la mayor actividad de uno de los ojos. De esta manera, la visión del animal se veía comprometida de forma permanente cuando un tiempo después se abría de nuevo el ojo ocluido. Por tanto, la falta de estimulación adecuada durante el periodo sensible de desarrollo visual – derivado de la deprivación monocular – provocaba un desarrollo anómalo de la corteza visual. Esto es debido a que fuera de ciertos periodos concretos la plasticidad expectante de experiencia se reduce sensiblemente. En otras palabras, más allá de los periodos sensibles la influencia de estas mismas experiencias será mucho más limitada. Con lo cual, resulta fundamental que los individuos se expongan a diferentes experiencias para producir los cambios cerebrales esperados en los miembros de su especie. En relación con esto, teniendo en cuenta que en el caso de los humanos los periodos sensibles pueden ser temporalmente diferentes según el tipo de experiencia – estímulos auditivos (Lopez-Higes et al., 2015), estímulos visuales (Liao et al., 2004) y lenguaje (Johnson and Newport, 1989; Kuhl, 2010), entre otros – cabría preguntarse si el concepto de “socialización” en etología clínica es excesivamente amplio, pues parece que abarcaría todo tipo de experiencias en unos tiempos muy delimitados.

Por otra parte, se sabe que el estrés materno y el postnatal temprano pueden modificar la reactividad del individuo al estrés en el futuro (Weinstock, 2008; Del Giudice, 2012; Herpfer et al., 2012). Encontramos un ejemplo impactante en humanos tras el ataque al World Trade Center de Nueva York. Se hizo el seguimiento de un grupo de mujeres embarazadas que desarrollaron estrés postraumático a raíz del atentado y se encontraron niveles alterados de cortisol en los bebés que dieron a luz (Yehuda et al., 2005). Además, se hizo el seguimiento de estos niños y se vio que a los nueve meses tenían una mayor propensión al estrés provocado por ruidos fuertes, personas desconocidas o alimentos nuevos (Brand et al., 2006). Por otro lado, también se sabe que las variaciones en las interacciones materno-filiales durante estas etapas tempranas pueden modular

una amplia variedad de comportamientos en la edad adulta, en parte debido a modificaciones que se producen en eje HPA (Cameron et al., 2005). Entre estos comportamientos que pueden verse influidos por la variación en el cuidado maternal están los defensivos (Champagne and Curley, 2005; Diorio and Meaney, 2007; Champagne et al., 2008).

En definitiva, resulta fundamental garantizar la experiencia postnatal con el ambiente para un desarrollo normal de los sentidos y del sistema nervioso de las especies domésticas con las que convivimos. En concreto, teniendo en cuenta cómo la experiencia temprana puede moldear el comportamiento defensivo de los animales, resulta obvia la recomendación de evitar que los perros y los gatos permanezcan en tiendas durante estos periodos tan determinantes.

3.3. Limitaciones y direcciones futuras en las intervenciones que reducen el estrés

En el Capítulo 3 planteamos dudas con respecto a una recomendación que se suele dar cuando un perro muestra respuestas defensivas en un contexto de amenaza, concretamente la de ignorar al animal (Cracknell and Mills, 2008) “para no reforzar su miedo” (Lindsay, 2005; Levine, 2009; Palestrini, 2009). Cabe señalar que esta sugerencia no suele ir acompañada de estudios que avalen su eficacia. En este sentido, en ocasiones se recurre de forma inconsciente a la experiencia personal al dar ciertas recomendaciones (Overall, 2010). Por suerte el estudio del comportamiento animal ha generado – y sigue generando – una ingente cantidad de información que permite adoptar un enfoque basado en los datos.

Centrándonos en el tema que nos atañe, se ha visto que el estrés puede tener un efecto en todas las fases en las que se construye la memoria (codificación, consolidación, recuperación y reconsolidación) (Schwabe et al., 2012). Particularmente nos interesa su efecto sobre determinados procesos que intervienen en las terapias de exposición a estímulos que usamos de forma habitual, como la extinción. En el Capítulo 1 señalábamos la importancia del contexto en las situaciones de amenaza, llegando incluso a competir por el control de la propia conducta (Bouton, 2010). En este marco, está ampliamente estudiada la fragilidad del aprendizaje de extinción en cuanto a la relativa facilidad con la que se pueden revertir sus efectos. Esto puede ocurrir por el simple paso del tiempo (recuperación espontánea), el regreso al contexto en el que se produjo la memoria original (renovación) o la exposición al estímulo incondicionado (restablecimiento) (Bouton, 2004; Bouton, 2014). Además, otro factor que puede ocasionar la recuperación de las respuestas condicionadas es

la exposición al estrés. Esto es, las situaciones estresantes – sobre todo si no están relacionadas con el aprendizaje original – pueden provocar recuperación espontánea de las respuestas tras haberse desarrollado un procedimiento de extinción, tanto en personas (Raio et al., 2014), como en otros animales (Deschaux et al., 2013). Por ejemplo, Jacobs y Nadel reportaron la reaparición de fobias tratadas con éxito tras eventos estresantes no relacionados con dichas fobias, como un accidente de tráfico o la muerte de un familiar (Jacobs and Nadel, 1985). No obstante, cabe indicar que los efectos de las hormonas liberadas durante el estrés sobre la extinción son complejos e incluso pueden llegar a ser opuestos según la fase de aprendizaje a la que afecten (Rodrigues et al., 2009). En cualquier caso, este efecto del estrés en la recuperación de la memoria de extinción puede suponer una limitación importante en las estrategias de tratamiento empleadas. Por tal motivo, en los trabajos que incluyen este procedimiento se recomienda realizar las exposiciones en diferentes situaciones y momentos del día e incluso en presencia y ausencia de determinadas personas (LeDoux, 2015).

Por otra parte, existe un enfoque relativamente novedoso que puede ser de ayuda en el contexto de los problemas defensivos y del que todavía no se ha debatido dentro de la etología clínica: la reconsolidación de la memoria (Nader et al., 2000). Hasta hace unos años se creía que las memorias ya consolidadas permanecían estables de forma permanente. Sin embargo, ahora se sabe que una memoria consolidada puede atravesar periodos de labilidad en los que puede ser modificada (Lee, 2010; De Oliveira Alvares et al., 2013). Esta ventana de plasticidad sináptica ha sido evidenciada en numerosas especies y paradigmas comportamentales – el aprendizaje espacial, la aversión al sabor, las habilidades motrices y el condicionamiento de amenaza, entre otros –, así como aplicando diferentes tratamientos (Nader and Einarsson, 2010). En humanos la investigación se ha focalizado en desarrollar protocolos de tratamiento de diferentes psicopatologías, como el estrés postraumático (Brunet et al., 2011), la adicción a drogas (Xue et al., 2012) y las fobias (Soeter and Kindt, 2015). En nuestro contexto particular posiblemente el efecto que nos podría interesar en mayor medida es el de debilitar memorias no adaptativas. Aunque todavía hoy existe un gran debate sobre cuán efectiva podrá ser la reconsolidación en los entornos clínicos, merecería la pena que se explorara también desde nuestro campo, pues las posibles aplicaciones son numerosas.

4. PARÁMETROS CONDUCTUALES & FISIOLÓGICOS COMO REFLEJO DE LOS ESTADOS EMOCIONALES

4.1. Concepciones clásicas de las emociones versus teorías constructivistas

Retomando la discusión del primer apartado, influyentes investigadores de la etología clínica llevan tiempo instando a que se eliminen las etiquetas sesgadas social o culturalmente y a que se refinen los descriptores empleados (Overall, 2014a). En este marco, en el Capítulo 3 señalábamos un renacimiento del antropomorfismo en las últimas décadas (Wynne, 2007) que ha llevado a sesgos sustanciales en los estudios con animales (Povinelli, 2004) y a la utilización de metodologías menos rigurosas (Heyes, 2008; Povinelli et al., 2000). En esta línea, planteábamos las consecuencias que pueden acarrear este tipo de atribuciones en el contexto doméstico.

El lenguaje asociado a las emociones incluye innumerables palabras. Frente a esta terminología exuberante la reacción por parte de los investigadores fue (y para algunos sigue siendo) tratar de condensar la lista en unas pocas emociones primarias (Lang and Davis, 2006). Darwin fue quien inició tiempo atrás los estudios sobre expresión facial (Darwin, 1872). Y aunque otros investigadores como Landis (1929), Schlosberg (1954) y Tomkins (1962) profundizaron en el carácter transcultural y universal de las emociones, fueron Izard (1992, 2007) y Ekman (1977, 1999) quienes popularizaron el concepto de las emociones básicas o primarias, siendo especialmente influyente el trabajo de este último. Ambos identificaron seis emociones básicas: alegría, ira, miedo, sorpresa, asco y tristeza. En general, los partidarios de esta teoría proponen que las emociones primarias se agrupan dentro de un hipotético módulo neural que desencadena respuestas conductuales y fisiológicas, así como los sentimientos correspondientes, al activarse mediante un estímulo apropiado (LeDoux, 2019). Dicho de otro modo, es como si lleváramos incorporadas estas emociones desde el nacimiento. Aunque la lista de emociones de Ekman es el ejemplo canónico, han surgido diferentes teorías contemporáneas reconociendo un número variable de estas. Por ejemplo, Plutchik desarrolló una teoría en la que incluía ocho emociones básicas (miedo, ira, alegría, tristeza, aceptación, disgusto, anticipación y sorpresa) y otras tantas emociones avanzadas compuestas de las primeras (Plutchik, 1980, 2001). Por su parte, un estudio reciente sugirió que eran más bien cuatro (Jack et al., 2014). Este es precisamente uno de los argumentos en contra de la concepción clásica, pues las diferentes teorías proponen diferentes emociones, tanto en número como en nombres para definir las. Además, se han puesto en duda los métodos utilizados habitualmente para identificarlas. En concreto, se cuestiona

el uso de la elección forzada de la emoción expresada en una cara de una lista corta de etiquetas en lugar de emplear el libre etiquetado (Russell, 1994). En este aspecto, hace unos años Barrett cuestionó directamente la idea de que el cerebro humano haya conservado evolutivamente circuitos neuronales para las emociones primarias. La investigadora propone que las llamadas emociones básicas son en realidad conceptos psicológicamente contruidos que se etiquetan con palabras aprendidas de nuestra cultura (Barrett, 2006; Barrett, 2007). De forma similar, para LeDoux las emociones consistirían en evaluaciones cognitivas de situaciones que afectan el bienestar personal, por lo que requerirían procesos cognitivos complejos y autoconsciencia (LeDoux, 2019). En el caso que nos ocupa, la concepción clásica considera el miedo como una emoción básica universal. Sin embargo, según el enfoque que desarrollamos en el Capítulo 3, el miedo no sería algo que se desatara desde un circuito innato. Sería más bien un estado consciente derivado de una interpretación cognitiva basada en parte en componentes no conscientes (LeDoux, 2015). En palabras del propio LeDoux: “aunque se suele decir que el miedo es universal, lo que es universal es el peligro” (Mobbs et al., 2019).

La integración de la teoría de las emociones básicas en el imaginario popular ha llevado a un enredo conceptual en torno al miedo y a la ansiedad. Específicamente se ha mezclado la existencia de sistemas innatos encargados de detectar y responder a estímulos significativos con sistemas cuya función es la de dar lugar a los sentimientos conscientes (LeDoux, 2015). A este respecto, el cerebro está preparado para identificar los estímulos relevantes para la supervivencia y reaccionar ante situaciones de peligro real o anticipado. Esta reacción en humanos va acompañada de estados subjetivos. En el caso del resto de los animales, algunos utilizan operaciones cognitivas complejas para guiar su comportamiento (Dickinson, 2012), pero la pregunta clave está en si tienen consciencia de esos estados mentales. En este sentido, vimos en el Capítulo 3 que la palabra miedo en ocasiones hace referencia al sentimiento (la experiencia consciente), otras veces a las respuestas fisiológicas y conductuales, por momentos se refiere a la motivación para realizar respuestas instrumentales y en otras ocasiones a las evaluaciones cognitivas (LeDoux, 2019). O incluso a todo junto. Si uno se adscribe a las teorías clásicas y acepta que el miedo y la ansiedad son emociones básicas conservadas a lo largo de la evolución, lo esperable es que acabe pensando que la evaluación de las respuestas de los animales en contextos desafiantes está necesariamente asociada a estas emociones. De hecho, a pesar de que hoy por hoy no se pueden demostrar que las experiencias sean similares a las de los humanos, se asume por analogía que los patrones de comportamiento y fisiológicos de los animales en contextos de amenaza indican miedo o ansiedad. Por ejemplo, si se observa a un perro o a un gato exhibiendo *freezing* es frecuente que se acabe concluyendo que ese individuo tiene miedo. Pero a

diferencia de los patrones de comportamiento, los procesos cognitivos no pueden observarse directamente. Son inferencias del comportamiento y ya comentamos en el Capítulo 3 que la especulación es demasiado fácil de generar desde una perspectiva antropomórfica (Shettleworth, 2010). Por tanto, al vincular la congelación o la inhibición conductual a palabras como el miedo o la ansiedad inevitablemente se enreda el significado de estos comportamientos con el de los estados subjetivos. De esta forma, se asigna al sentimiento de miedo la responsabilidad de las respuestas de defensa provocadas por las amenazas (LeDoux, 2015). En este aspecto, conviene señalar que existen numerosos mecanismos cognitivos no conscientes importantes incluso para explicar gran parte del comportamiento humano (Shettleworth, 2010). Concretamente, se ha visto que en personas expuestas a estímulos subliminales de los que no son conscientes se activan los circuitos subcorticales de defensa que implican a la amígdala, generándose además respuestas fisiológicas asociadas. En estas situaciones los participantes no son capaces de informar sobre ningún sentimiento de miedo a pesar de las respuestas detectadas, por lo que no parece que la experiencia del miedo las estuviera impulsando (Mobbs et al., 2019).

4.2. Importancia de una terminología precisa que permita discriminar entre los diferentes procesos que se dan en los contextos defensivos

Más allá del enfrentamiento de las teorías clásicas y constructivistas de las emociones, todavía hoy existe desacuerdo sobre la manera de definir e investigar el miedo. Sobre este punto, el artículo de Dean Mobbs y colaboradores ofrece una oportunidad única para comparar las distintas visiones de varios de los principales expertos en el campo de la neurociencia afectiva (Mobbs et al., 2019). Con todo, para entender cómo surgen las experiencias emocionales es necesario conocer el papel de los diferentes circuitos que pueden participar. En relación con esto, LeDoux propone un modelo con un fuerte componente evolutivo describiendo una serie de circuitos neuronales muy conservados entre los mamíferos y fundamentales para enfrentar los desafíos vitales. Estos circuitos de supervivencia – que incluirían al menos los involucrados en la defensa, en el equilibrio de fluidos, en el mantenimiento de suministros energéticos, en la reproducción y en la termorregulación – no se encargarían de generar emociones conscientes, sino de controlar las respuestas conductuales y fisiológicas (LeDoux, 2012a). Al observar a un animal congelarse, huir, aparearse, comer o beber es fácil acabar proyectando nuestras propias experiencias y describir estas actividades como una expresión de estados conscientes, como sentir miedo o placer sexual, así como tener hambre o sed

(LeDoux, 2019). El propio Tinbergen apuntó a que la atribución del hambre, el miedo y otros estados mentales a los animales es una mera conjetura (Tinbergen, 1951). Entonces, en este enfoque, el miedo sería la evaluación cognitiva de que uno está en peligro. En palabras de LeDoux y Hofmann: “dicha evaluación podría surgir de la actividad en cualquier circuito de supervivencia (miedo a morir de hambre, a la deshidratación, a la hipotermia, al aislamiento reproductivo, etc.) o por preocupaciones existenciales (como el miedo a la eventualidad de la muerte o la falta de sentido de la vida de uno mismo), además de los peligros relacionados con la actividad del circuito defensivo de supervivencia” (LeDoux and Hofmann, 2018).

En este mismo orden de ideas, hemos comentado en otro apartado de esta discusión que tanto el sistema simpático-adrenal como el pituitario-adrenal responden al procesamiento de amenazas en la amígdala. Pero la activación de los circuitos de defensa no solo desencadena la respuesta fisiológica asociada, sino que también cambia la forma en la que se procesa la información a nivel cortical. Concretamente, a través de las numerosas conexiones de la amígdala con diferentes estructuras se incrementa la excitación cerebral, se aumenta la atención y el procesamiento sensorial, se afectan áreas relacionadas con la memoria y se generan una serie de reacciones innatas, así como comportamientos instrumentales (LeDoux, 2019). Todos ellos son procesos no emocionales que existen en el cerebro por otros motivos, pero que generan sentimientos cuando se unen en la consciencia (LeDoux, 2015). Por consiguiente, el sentimiento consciente que se experimentaría en esas situaciones sería solo una de las consecuencias de los estímulos o situaciones a las que nos vamos enfrentando.

Por ende, con el objetivo de evitar la nebulosa terminológica que hay en torno al miedo y la ansiedad, LeDoux y Pine proponen usar estas palabras de forma exclusiva para los estados mentales relacionados con experiencias humanas. Asimismo, instan a hacer una distinción clara entre ambos conceptos. De esta manera, el término miedo debería utilizarse para describir los sentimientos que ocurren ante amenazas inmediatas o inminentes y la palabra ansiedad para cuando estas son inciertas o distales en el tiempo o espacio (LeDoux and Pine, 2016). Para el resto de los animales plantean cambiar la terminología en un intento de evitar el solapamiento entre los mecanismos que subyacen a la sensación consciente de los que detectan y responden a los peligros. De tal forma que en lugar de condicionamiento del miedo sugieren hablar de condicionamiento de amenaza o decir respuestas de defensa en lugar de respuestas de miedo. Amenaza y defensa no son términos derivados específicamente de la experiencia subjetiva humana, por lo que al utilizarlos se evitarían ambigüedades.

4.3. Aproximación del debate a la ciencia del bienestar y a la etología clínica

Cabe destacar que este debate ya se ha trasladado a otras áreas fuera de la neurociencia afectiva. En el campo del bienestar de los animales domésticos no es raro encontrar estudios en los que se insiste a utilizar mediciones que teóricamente aportan información sobre el estado emocional del individuo (Paul et al., 2005; Kiddie and Collins, 2014; Polgár et al., 2019). A pesar de ello, Dawkins – una investigadora prominente de este campo – propuso no incluir las experiencias conscientes en la definición de bienestar y basarse únicamente en criterios observables que hoy por hoy puedan valorarse de forma científica (Dawkins, 2017). En concreto incluye dos criterios: la salud física y dar a los animales lo que quieren en cuanto a sus necesidades y preferencias. En este aspecto, en los últimos años han surgido diferentes trabajos que han analizado dichas necesidades a nivel ambiental en perros (Döring et al., 2016a, 2016b) y en gatos (Pachel and Neilson, 2010), así como a nivel social (Kwok et al., 2016). Puede que esta línea de investigación arroje conclusiones más claras y aplicables con respecto al bienestar de los animales.

Por otra parte, viendo el caos terminológico que anega el campo de la etología clínica parece importante acercar también el debate a esta área. En cualquier caso, realmente la medicina del comportamiento no es ajena a este tipo de discusiones en torno al uso de determinadas etiquetas. Por ejemplo, la controversia sobre el empleo de la palabra dominancia lleva años instalada en nuestro campo (Bradshaw et al., 2009; Schilder et al., 2014; Bradshaw et al., 2015). En tal sentido, Westgarth hace una exposición muy clara con respecto al debate actual (Westgarth, 2016). Por su parte, Overall plantea una serie de preguntas interesantes que deberían responderse antes de decidir emplear este término (Overall, 2014c) y que además podrían extenderse a muchos otros conceptos. De hecho, dichas preguntas coinciden parcialmente con algunas de las cuestiones que LeDoux sugiere que habría que plantearse al definir y utilizar la palabra miedo (LeDoux, 2017).

En definitiva, teniendo en cuenta lo expuesto, es fundamental ir con especial cautela a la hora de pretender extrapolar los resultados de las medidas comportamentales y fisiológicas que podamos recabar en los estudios con animales a posibles experiencias conscientes.

5. REFERENCIAS

- Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., & Seren, E. (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology*, *155*(2), 398–402. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.07.002
- Amat, M., Camps, T., Le Brech, S., & Manteca, X. (2014). Separation anxiety in dogs: the implications of predictability and contextual fear for behavioural treatment. *Animal Welfare*, *23*(3), 263–266. doi: 10.7120/09627286.23.3.263
- Amat, M., Camps, T., & Manteca, X. (2016). Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *18*(8), 577–586. doi: 10.1177/1098612x15590867
- Anagnostaras, S. G., Wood, S. C., Shuman, T., Cai, D. J., Leduc, A. D., Zurn, K. R., ... Herrera, G. M. (2010). Automated assessment of pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the video freeze system. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *4*, 158. doi:10.3389/fnbeh.2010.00158
- Arhant, C., Bubna-Littitz, H., Bartels, A., Futschik, A., & Troxler, J. (2010). Behaviour of smaller and larger dogs: Effects of training methods, inconsistency of owner behaviour and level of engagement in activities with the dog. *Applied Animal Behaviour Science*, *123*(3-4), 131–142. doi: 10.1016/j.applanim.2010.01.003
- Barrett, L. F. (2006). Are emotions natural kinds? *Perspectives on Psychological Science*, *1*(1), 28–58. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6916.2006.00003.x>
- Barrett, L. F., Lindquist, K. A., Bliss-Moreau, E., Duncan, S., Gendron, M., Mize, J., & Brennan, L. (2007). Of mice and men: Natural kinds of emotions in the mammalian brain? A response to Panksepp and Izard. *Perspectives on Psychological Science*, *2*(3), 297–312. doi: 10.1111/j.1745-6916.2007.00046.x
- Beaver, B. V. G. (2009). *Canine behavior: insights and answers*. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier.

- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., & de Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *52*(3-4), 307–319. doi: 10.1016/s0168-1591(96)01131-8
- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *58*(3-4), 365–381. doi: 10.1016/s0168-1591(97)00145-7
- Beerda, B., Schilder, M. B., Bernadina, W., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior*, *66*(2), 243–254. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00290-x
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*, *9*(1), 49-62.
- Bergeron, R., Scott, S. L., Émond, J. P., Mercier, F., Cook, N. J. & Schaefer, A. L. (2002). Physiology and behavior of dogs during air transport. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *66*(3), 211-216.
- Blackwell, E. J., Bodnariu, A., Tyson, J., Bradshaw, J. W., & Casey, R. A. (2010). Rapid shaping of behaviour associated with high urinary cortisol in domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *124*(3-4), 113–120. doi: 10.1016/j.applanim.2010.02.011
- Blackwell, E. J., Bradshaw, J. W., & Casey, R. A. (2013). Fear responses to noises in domestic dogs: Prevalence, risk factors and co-occurrence with other fear related behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, *145*(1-2), 15–25. doi: 10.1016/j.applanim.2012.12.004
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Rodgers, R. J. (1991). Risk assessment and animal models of anxiety. In: B. Olivier, J. Mos, J. L. Slangen (Ed.), *Animal Models in Psychopharmacology* (pp. 117–134). Basel: Birkhäuser.
- Blanchard, R. J., Flannelly, K. J., & Blanchard, D. C. (1986). Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology*, *100*(2), 101–107. doi: 10.1037//0735-7036.100.2.101

Discusión general

- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*, *103*(1), 70–82. doi: 10.1037//0735-7036.103.1.70
- Boeke, E. A., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., Phelps, E. A., & Hartley, C. A. (2017). Active avoidance: Neural mechanisms and attenuation of pavlovian conditioned responding. *The Journal of Neuroscience*, *37*(18), 4808–4818. doi: 10.1523/jneurosci.3261-16.2017
- Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, *11*(5), 485–494. doi: 10.1101/lm.78804
- Bouton, M. E. (2010). The multiple forms of context in associative learning. In: B. Mesquita, L. F. Barrett, E. Smith (Ed.), *The mind in context* (pp. 233-258). New York: The Guilford Press.
- Bouton, M. E. (2014). Why behavior change is difficult to sustain. *Preventive Medicine*, *68*, 29–36. doi: 10.1016/j.ypmed.2014.06.010
- Bradshaw, J. W., Blackwell, E. J., & Casey, R. A. (2009). Dominance in domestic dogs—useful construct or bad habit? *Journal of Veterinary Behavior*, *4*(3), 135–144. doi: 10.1016/j.jveb.2008.08.004
- Bradshaw, J. W., Blackwell, E. J., & Casey, R. A. (2015). Dominance in domestic dogs—A response to Schilder et al. (2014). *Journal of Veterinary Behavior*, *11*, 102–108. doi: 10.1016/j.jveb.2015.11.008
- Brand, S. R., Engel, S. M., Canfield R. L., Yehuda, R. (2006). The effect of maternal PTSD following in utero trauma exposure on behavior and temperament in the 9-month-old infant. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1071*(1), 454–458. doi: 10.1196/annals.1364.041
- Broom, D. M., & Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Brunet, A., Poundja, J., Tremblay, J., Bui, É., Thomas, É., Orr, S. P., ... Pitman, R. K. (2011). Trauma reactivation under the influence of propranolol decreases posttraumatic stress symptoms and disorder: 3 open-label trials. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *31*(4), 547–550. doi: 10.1097/jcp.0b013e318222f360

- Bryan, H. M., Adams, A. G., Invik, R. M., Wynne-Edwards, K. E., Smits, J. E. (2013). Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(2), 189–196.
- Buffington, C. A., Westropp, J. L., Chew, D. J., & Bolus, R. R. (2006). Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8(4), 261–268. doi: 10.1016/j.jfms.2006.02.002
- Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2007). Escape from fear: A detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 33(4), 451–463. doi: 10.1037/0097-7403.33.4.451
- Cameron, M. E., Casey, R. A., Bradshaw, J. W., Waran, N. K., & Gunn-Moore, D. A. (2004). A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. *Journal of Small Animal Practice*, 45(3), 144–147. doi: 10.1111/j.1748-5827.2004.tb00216.x
- Cameron, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., & Meaney, M. J. (2005). The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 843–865. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.022
- Carlstead, K., Brown, J. L., & Strawn, W. (1993). Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behaviour Science*, 38(2), 143–158. doi: 10.1016/0168-1591(93)90062-t
- Champagne, D. L., Bagot, R. C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M. J., de Kloet, E. R., ... Krugers, H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: Evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *Journal of Neuroscience*, 28(23), 6037–6045. doi: 10.1523/jneurosci.0526-08.2008
- Champagne, F. A., & Curley, J. P. (2005). How social experiences influence the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), 704–709. doi: 10.1016/j.conb.2005.10.001

Discusión general

- Cohen, J. A., & Fox, M. W. (1976). Vocalizations in wild canids and possible effects of domestication. *Behavioural Processes*, *1*(1), 77–92. doi: 10.1016/0376-6357(76)90008-5
- Cracknell, N. R., & Mills, D. S. (2008). A double-blind placebo-controlled study into the efficacy of a homeopathic remedy for fear of firework noises in the dog (*Canis familiaris*). *The Veterinary Journal*, *177*(1), 80–88. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.04.007
- Darwin, C. (1872). *The expression of the emotions in man and animals*. London: John Murray.
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 105–135. doi: 10.1038/npp.2009.109
- Dawkins, M. S. (2006). A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology & Evolution*, *21*(2), 77–82. doi: 10.1016/j.tree.2005.10.017
- Dawkins, M. S. (2017). Animal welfare with and without consciousness. *Journal of Zoology*, *301*(1), 1–10. doi: 10.1111/jzo.12434
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, *244*, 42–48. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.005
- Defauw, P. A., Van de Maele, I., Duchateau, L., Polis, I. E., Saunders, J. H., & Daminet, S. (2011). Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *13*(12), 967–975. doi: 10.1016/j.jfms.2011.08.001
- Del Giudice, M. (2012). Fetal programming by maternal stress: Insights from a conflict perspective. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(10), 1614–1629. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.014
- Deschaux, O., Zheng, X., Lavigne, J., Nachon, O., Cleren, C., Moreau, J. L., & Garcia, R. (2013). Post-extinction fluoxetine treatment prevents stress-induced reemergence of extinguished fear. *Psychopharmacology*, *225*(1), 209–216. doi: 10.1007/s00213-012-2806-x

- Dickinson, A. (2012). Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1603), 2733–2742. doi: 10.1098/rstb.2012.0220
- Diederich, C., & Giffroy, J.-M. (2006). Behavioural testing in dogs: A review of methodology in search for standardisation. *Applied Animal Behaviour Science*, 97(1), 51–72. doi: 10.1016/j.applanim.2005.11.018
- Diorio, J., & Meaney, M. J. (2007). Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 32(4), 275–284.
- Döring, D., Haberland, B. E., Bauer, A., Dobenecker, B., Hack, R., Schmidt, J., & Erhard, M. H. (2016a). Behavioral observations in dogs in 4 research facilities: Do they use their enrichment? *Journal of Veterinary Behavior*, 13, 55–62. doi: 10.1016/j.jveb.2016.04.002
- Döring, D., Ketter, D. A., Klima, A., Küchenhoff, H., Dobenecker, B., Schmidt, J., & Erhard, M. H. (2016b). Horn of calf hooves as chews in laboratory dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 13, 39–45. doi: 10.1016/j.jveb.2016.03.010
- Dreschel, N. A. (2010). The effects of fear and anxiety on health and lifespan in pet dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 125(3-4), 157–162. doi: 10.1016/j.applanim.2010.04.003
- Dreschel, N. A., & Granger, D. A. (2005). Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science*, 95(3-4), 153–168. doi: 10.1016/j.applanim.2005.04.009
- Edney, A. T. B. (1998). Reasons for the euthanasia of dogs and cats. *Veterinary Record*, 143(4), 114. doi: 10.1136/vr.143.4.114
- Ekman, P. (1977). Biological and cultural contributions to body and facial movement. In: J. Blacking (Ed.), *The Anthropology of the Body* (pp. 34-84). London: Academic Press.
- Ekman, P. (1999). Basic emotions. In: T. Dalgleish, & M. J. Power (Ed.), *Handbook of Cognition and Emotion* (pp. 45-60). New York, NY: John Wiley & Sons Ltd.
- Enck, P., & Holtmann, G. (1992). Stress and gastrointestinal motility in animals: a review of the literature. *Neurogastroenterology & Motility*, 4(2), 83–90. doi: 10.1111/j.1365-2982.1992.tb00084.x

Discusión general

- Fanselow, M. S., & Bolles, R. C. (1980). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Pain*, 9(3), 389. doi: 10.1016/0304-3959(80)90065-2
- Fossat, P., Bacque-Cazenave, J., De Deurwaerdere, P., Delbecque, J.-P., & Cattaert, D. (2014). Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science*, 344(6189), 1293–1297. doi: 10.1126/science.1248811
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press.
- Greenough, W. T., Black, J. E., & Wallace, C. S. (1987). Experience and brain development. *Child Development*, 58(3), 539-559. doi: 10.2307/1130197
- Gruen, M. E., Case, B. C., Foster, M. L., Lazarowski, L., Fish, R. E., Landsberg, G., ... Sherman, B. L. (2015). The use of an open-field model to assess sound-induced fear and anxiety-associated behaviors in Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(4), 338–345. doi: 10.1016/j.jveb.2015.03.007
- Habib, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(3), 695–728. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70208-5
- Hagenaars, M. A., Oitzl, M., & Roelofs, K. (2014). Updating freeze: Aligning animal and human research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 47, 165–176. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.021
- Hammack, S. E., Todd, T. P., Kocho-Schellenberg, M., & Bouton, M. E. (2015). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the acquisition of contextual fear at long or short context-shock intervals. *Behavioral Neuroscience*, 129(5), 673–678. doi: 10.1037/bne0000088
- Heimbürge, S., Kanitz, E., & Otten, W. (2019). The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology*, 270, 10–17. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.09.016
- Hennessy, M. B. (2013). Using hypothalamic–pituitary–adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 149(1-4), 1–12. doi: 10.1016/j.applanim.2013.09.004

- Hennessy, M. B., Davis, H. N., Williams, M. T., Mellott, C., Douglas, C. W. (1997). Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiology & Behavior*, *62*(3), 485–490. doi: 10.1016/s0031-9384(97)80328-9
- Hennessy, M. B., Voith, V. L., Mazzei, S. J., Buttram, J., Miller, D. D., & Linden, F. (2001). Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied Animal Behaviour Science*, *73*(3), 217–233. doi: 10.1016/s0168-1591(01)00139-3
- Herpfer, I., Hezel, H., Reichardt, W., Clark, K., Geiger, J., Gross, C. M., ... Normann, C. (2012). Early life stress differentially modulates distinct forms of brain plasticity in young and adult mice. *PLoS ONE*, *7*(10), e46004. doi: 10.1371/journal.pone.0046004
- Heyes, C. (2008). Beast machines? Questions of animal consciousness. In: M. Davies, L. Weiskrantz (Ed.), *Frontiers of consciousness* (pp. 259 – 274). Oxford: Oxford University Press.
- Holland, P. C., & Gallagher, M. (1999). Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(2), 65–73. doi: 10.1016/s1364-6613(98)01271-6
- Hydbring-Sandberg, E., von Walter, L. W., Höglund, K., Svartberg, K., Swenson, L., & Forkman, B. (2004). Physiological reactions to fear provocation in dogs. *Journal of Endocrinology*, *180*(3), 439–448. doi: 10.1677/joe.0.1800439
- Izard, C. E. (1992). Basic emotions, relations among emotions, and emotion-cognition relations. *Psychological Review*, *99*(3), 561–565. doi: 10.1037//0033-295x.99.3.561
- Izard, C. E. (2007). Basic emotions, natural kinds, emotion schemas, and a new paradigm. *Perspectives on Psychological Science*, *2*(3), 260–280. doi: 10.1111/j.1745-6916.2007.00044.x
- Jack, R. E., Garrod, O. G., & Schyns, P. G. (2014). Dynamic facial expressions of emotion transmit an evolving hierarchy of signals over time. *Current Biology*, *24*(2), 187–192. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.064
- Jacobs, W. J., & Nadel, L. (1985). Stress-induced recovery of fears and phobias. *Psychological Review*, *92*(4), 512–531. doi: 10.1037//0033-295x.92.4.512

- Johnson, J. S., & Newport, E. L. (1989). Critical period effects in second language learning: The influence of maturational state on the acquisition of English as a second language. *Cognitive Psychology*, *21*(1), 60–99. doi: 10.1016/0010-0285(89)90003-0
- Jones, A. C., & Gosling, S. D. (2005). Temperament and personality in dogs (*Canis familiaris*): A review and evaluation of past research. *Applied Animal Behaviour Science*, *95*(1-2), 1–53. doi: 10.1016/j.applanim.2005.04.008
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., & Davidson, R. J. (2004). The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *Journal of Neuroscience*, *24*(24), 5506–5515. doi: 10.1523/jneurosci.0292-04.2004
- Kiddie, J. L., & Collins, L. M. (2014). Development and validation of a quality of life assessment tool for use in kennelled dogs (*Canis familiaris*). *Applied Animal Behaviour Science*, *158*, 57–68. doi: 10.1016/j.applanim.2014.05.008
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Gibb, R. (2013). Brain plasticity in the developing brain. *Progress in Brain Research*, *207*, 35–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63327-9.00005-9>
- Kozłowska, K., Walker, P., McLean, L., & Carrive, P. (2015). Fear and the defense cascade: Clinical implications and management. *Harvard review of psychiatry*, *23*(4), 263–287. doi:10.1097/HRP.0000000000000065
- Kuhl, P. K. (2010). Brain mechanisms in early language acquisition. *Neuron*, *67*(5), 713–727. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.038
- Kuhne, F., Hößler, J. C., & Struwe, R. (2012). Effects of human–dog familiarity on dogs’ behavioural responses to petting. *Applied Animal Behaviour Science*, *142*(3-4), 176–181. doi: 10.1016/j.applanim.2012.10.003
- Kwok, Y. E., von Keyserlingk, M. A., Sprea, G., & Molento, C. F. M. (2016). Human-animal interactions of community dogs in Campo Largo, Brazil: A descriptive study. *Journal of Veterinary Behavior*, *13*, 27–33. doi: 10.1016/j.jveb.2016.03.006
- Landis, C. (1929). The interpretation of facial expression in emotion. *The Journal Of General Psychology*, *2*(1), 59–72. doi: 10.1080/00221309.1929.9918042

- Landsberg, G. M., Beck, A., Lopez, A., Deniaud, M., Araujo, J. A., & Milgram, N. W. (2015). Dog-appeasing pheromone collars reduce sound-induced fear and anxiety in beagle dogs: a placebo-controlled study. *Veterinary Record*, *177*(10), 260. doi: 10.1136/vr.103172
- Lang, P. J., & Davis, M. (2006). Emotion, motivation, and the brain: Reflex foundations in animal and human research. *Progress in Brain Research*, *156*, 3–29. doi: 10.1016/s0079-6123(06)56001-7
- Lay, D. C. (2010). Stress. In: D. S. Mills (Ed.), *The Encyclopedia of Applied Animal Behaviour and Welfare* (pp. 582-584). Wallingford, UK: CAB International.
- LeDoux, J. E. (1996). *The Emotional Brain*. New York: Simon and Schuster.
- LeDoux, J. E. (2012a). Rethinking the emotional brain. *Neuron*, *73*(4), 653-676. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.004
- LeDoux, J. E. (2012b). Evolution of human emotion: a view through fear. *Progress in Brain Research*, *195*, 431–442. doi: 10.1016/b978-0-444-53860-4.00021-0
- LeDoux, J. E. (2015). *Anxious: Using the brain to understand and treat fear and anxiety*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E. (2017). Semantics, surplus meaning, and the science of fear. *Trends in Cognitive Sciences*, *21*(5), 303–306. doi: 10.1016/j.tics.2017.02.004
- LeDoux, J. E. (2019). *The Deep History of Ourselves: The Four-Billion-Year Story of How We Got Conscious Brains*. New York: Viking.
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and anxiety: a two-system framework. *American Journal of Psychiatry*, *173*(11), 1083–1093. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.16030353
- LeDoux, J. E., & Hofmann, S. G. (2018). The subjective experience of emotion: a fearful view. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *19*, 67–72. doi: 10.1016/j.cobeha.2017.09.011
- Lee, J. L. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*, 168. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00168

Discusión general

- Levine, E. (2009). Sound sensitivities. In: D. F. Horowitz, D. S. Mills (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine* (pp. 159-168). Gloucester: BSAVA.
- Levine, E. D., Ramos, D., & Mills, D. S. (2007). A prospective study of two self-help CD based desensitization and counter-conditioning programmes with the use of Dog Appeasing Pheromone for the treatment of firework fears in dogs (*Canis familiaris*). *Applied Animal Behaviour Science*, *105*(4), 311–329. doi: 10.1016/j.applanim.2006.11.006
- Liao, D. S., Krahe, T. E., Prusky, G. T., Medina, A. E., & Ramoa, A. S. (2004). Recovery of cortical binocularity and orientation selectivity after the critical period for ocular dominance plasticity. *Journal of Neurophysiology*, *92*(4), 2113–2121. doi: 10.1152/jn.00266.2004
- Linden, W., Earle, T. L., Gerin, W., & Christenfeld, N. (1997). Physiological stress reactivity and recovery: Conceptual siblings separated at birth? *Journal of Psychosomatic Research*, *42*(2), 117–135. doi: 10.1016/s0022-3999(96)00240-1
- Lindsay, S. R. (2005). *Handbook of applied dog behavior and training, Volume 3*. Ames: Blackwell Publishing.
- Liu, C. H., & Doan, S. N. (2019). Innovations in biological assessments of chronic stress through hair and nail cortisol: Conceptual, developmental, and methodological issues. *Developmental Psychobiology*, *61*(3), 465–476. doi: 10.1002/dev.21830
- Lopez-Higes, R., Gallego, C., Martin-Aragoneses, M. T., & Melle, N. (2015). Morpho-syntactic reading comprehension in children with early and late cochlear implants. *Journal of Deaf Studies and Deaf Education*, *20*(2), 136–146. doi: 10.1093/deafed/env004
- Luescher, A. U., & Reisner, I. R. (2008). Canine aggression toward familiar people: a new look at an old problem. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *38*(5), 1107–1130. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.04.008
- Lund, J. D., & Jørgensen, M. C. (1999). Behaviour patterns and time course of activity in dogs with separation problems. *Applied Animal Behaviour Science*, *63*(3), 219–236. doi: 10.1016/s0168-1591(99)00011-8
- Manteca, X. (2003). *Etología clínica veterinaria del perro y el gato*. Barcelona: Multimédica ediciones veterinarias.

- Masson, S., de la Vega, S., Gazzano, A., Mariti, C., da Graça, G., Halsberghe, C., ... Schoening, B. (2018). Electronic training devices: Discussion on the pros and cons of their use in dogs as a basis for the position statement of the European Society of Veterinary Clinical Ethology. *Journal of Veterinary Behavior*, 25, 71–75. doi: 10.1016/j.jveb.2018.02.006
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285–305. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005
- Mobbs, D. (2018). The ethological deconstruction of fear(s). *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 24, 32–37. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.02.008
- Mobbs, D., Adolphs, R., Fanselow, M. S., Barrett, L. F., LeDoux, J. E., Ressler, K., & Tye, K. M. (2019). Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. *Nature Neuroscience*, 22(8), 1205–1216. doi: 10.1038/s41593-019-0456-6
- Nader, K., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. doi: 10.1038/35021052
- Nader, K., Majidishad, P., Amorapanth, P., & LeDoux, J. E. (2001). Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learning & Memory*, 8(3), 156–163. doi: 10.1101/lm.38101
- Nader, K., & Einarsson, E. Ö. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1191(1), 27–41. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x
- Ohl, F., Arndt, S. S., & van der Staay, F. J. (2008). Pathological anxiety in animals. *The Veterinary Journal*, 175(1), 18–26. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.12.013
- Otovic, P., & Hutchinson, E. (2015). Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. *Altex*, 32(1), 41–50. doi:10.14573/altex.1406161
- Overall, K. L. (2010). Anecdote, personal experience, and the interpretation of data. *Journal of Veterinary Behavior*, 5(3), 121–122. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2010.03.003>
- Overall, K. L. (2014a). The ethogram project. *Journal of Veterinary Behavior*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2013.12.001>

Discusión general

- Overall, K. L. (2014b). Watching behavior: Normal, abnormal, and ethograms. *Journal of Veterinary Behavior*, 9(2), 47–49. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.02.002>
- Overall, K. L. (2014c). Heterospecific relationships and the riddle of measurement. *Journal of Veterinary Behavior*, 9(4), 141–142. doi: 10.1016/j.jveb.2014.05.002
- Overall, K. L. (2014d). Measuring stress, safety, and outcomes: Which measures are “good?” *Journal of Veterinary Behavior*, 9(6), 278–280. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.10.002>
- Overall, K. L. (2017). Behaviors as transcripts of data. *Journal of Veterinary Behavior*, 18, iv-vi. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.03.001>
- Overall, K. L., Dunham, A. E., & Juarbe-Diaz, S. V. (2016). Phenotypic determination of noise reactivity in 3 breeds of working dogs: A cautionary tale of age, breed, behavioral assessment, and genetics. *Journal of Veterinary Behavior*, 16, 113–125. doi: 10.1016/j.jveb.2016.09.007
- Pachel, C., & Neilson, J. (2010). Comparison of feline water consumption between still and flowing water sources: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 5(3), 130–133. doi: 10.1016/j.jveb.2010.01.001
- Palestrini, C. (2009). Situational sensitivities. In: D. F. Horowitz, D. S. Mills (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine* (pp. 169- 181). Gloucester: BSAVA.
- Palestrini, C., Minero, M., Cannas, S., Rossi, E., & Frank, D. (2010). Video analysis of dogs with separation-related behaviors. *Applied Animal Behaviour Science*, 124(1-2), 61–67. doi: 10.1016/j.applanim.2010.01.014
- Palmer, R., & Custance, D. (2008). A counterbalanced version of Ainsworths Strange Situation Procedure reveals secure-base effects in dog–human relationships. *Applied Animal Behaviour Science*, 109(2-4), 306–319. doi: 10.1016/j.applanim.2007.04.002
- Pastore, C., Pirrone, F., Balzarotti, F., Faustini, M., Pierantoni, L., & Albertini, M. (2011). Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 6(3), 188–194. doi: 10.1016/j.jveb.2011.01.001

- Paul, E. S., Harding, E. J., & Mendl, M. (2005). Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(3), 469–491. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.01.002
- Plutchik, R. (1980). A general psychoevolutionary theory of emotion. In: R. Plutchik & H. Kellerman (Ed.), *Emotion: Theory, research, and experience: Vol. 1. Theories of emotion* (pp. 3–33). New York: Academic Press.
- Plutchik, R. (2001). The nature of emotions: Human emotions have deep evolutionary roots, a fact that may explain their complexity and provide tools for clinical practice. *American Scientist*, *89*(4), 344–350. Retrieved from www.jstor.org/stable/27857503
- Polgár, Z., Blackwell, E. J., & Rooney, N. J. (2019). Assessing the welfare of kennelled dogs—A review of animal-based measures. *Applied Animal Behaviour Science*, *213*, 1–13. doi: 10.1016/j.applanim.2019.02.013
- Pongrácz, P., Molnár, C., & Miklósi, Á. (2010). Barking in family dogs: An ethological approach. *The Veterinary Journal*, *183*(2), 141–147. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.12.010
- Povinelli, D. J. (2004). Behind the ape's appearance: escaping anthropocentrism in the study of other minds. *Daedalus*, *133*(1), 29–41. doi: 10.1162/001152604772746675
- Povinelli, D. J., Bering, J. M., Giambrone, S. (2000). Toward a science of other minds: escaping the argument by analogy. *Cognitive Science*, *24*(3), 509–541. doi: 10.1016/s0364-0213(00)00023-9
- Raio, C. M., Brignoni-Perez, E., Goldman, R., & Phelps, E. A. (2014). Acute stress impairs the retrieval of extinction memory in humans. *Neurobiology of Learning and Memory*, *112*, 212–221. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.015
- Rehn, T., & Keeling, L. J. (2011). The effect of time left alone at home on dog welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *129*(2-4), 129–135. doi: 10.1016/j.applanim.2010.11.015
- Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., & Sapolsky, R. M. (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, *32*(1), 289–313. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135620

Discusión general

- Roelofs, K. (2017). Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1718), 20160206. doi: 10.1098/rstb.2016.0206
- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*(2), 89–95.
- Rooney, N. J., Gaines, S. A., & Bradshaw, J. W. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior*, *92*(5), 847–854. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.06.011
- Rosado, B., García-Belenguer, S., León, M., Chacón, G., Villegas, A., & Palacio, J. (2010). Blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *123*(3-4), 124–130. doi: 10.1016/j.applanim.2010.01.009
- Roth, L. S., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, *6*(1), 19631. doi: 10.1038/srep19631
- Rugaas, T. (2006). *On talking terms with dogs: calming signals*. Wenatchee, WA: Dogwise Publishing.
- Rushen, J. (1991). Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *28*(4), 381–386. doi: 10.1016/0168-1591(91)90170-3
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589–601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
- Russell, J. A. (1994). Is there universal recognition of emotion from facial expression? A review of the cross-cultural studies. *Psychological Bulletin*, *115*(1), 102–141. doi: 10.1037/0033-2909.115.1.102
- Salman, M. D., Hutchison, J., Ruch-Gallie, R., Kogan, L., New, J. C., Kass, P. H., & Scarlett, J. M. (2000). Behavioral reasons for relinquishment of dogs and cats to 12 shelters. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *3*(2), 93–106. doi: 10.1207/s15327604jaws0302_2

- Scaglia, E., Cannas, S., Minero, M., Frank, D., Bassi, A., & Palestrini, C. (2013). Video analysis of adult dogs when left home alone. *Journal of Veterinary Behavior*, *8*(6), 412–417. doi: 10.1016/j.jveb.2013.04.065
- Schatz, S., & Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications*, *25*(4), 271–287. doi: 10.1023/a:1010626608498
- Schilder, M. B., Vinke, C. M., & van der Borg, J. A. (2014). Dominance in domestic dogs revisited: Useful habit and useful construct? *Journal of Veterinary Behavior*, *9*(4), 184–191. doi: 10.1016/j.jveb.2014.04.005
- Schlosberg, H. (1954). Three dimensions of emotion. *Psychological Review*, *61*(2), 81–88. doi: 10.1037/h0054570
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1740–1749. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.07.002
- Shettleworth, S. J. (2010). *Cognition, Evolution and Behavior*. New York: Oxford University Press.
- Siniscalchi, M., Mcfarlane, J. R., Kauter, K. G., Quaranta, A., & Rogers, L. J. (2013). Cortisol levels in hair reflect behavioural reactivity of dogs to acoustic stimuli. *Research in Veterinary Science*, *94*(1), 49–54. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.02.017
- Soeter, M., & Kindt, M. (2015). An abrupt transformation of phobic behavior after a post-retrieval amnesic agent. *Biological Psychiatry*, *78*(12), 880–886. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.04.006
- Stalder, T., & Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair – State of the art and future directions. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(7), 1019–1029. doi: 10.1016/j.bbi.2012.02.002
- Stalder, T., Steudte-Schmiedgen, S., Alexander, N., Klucken, T., Vater, A., Wichmann, S., Kirschbaum, C., & Miller, R. (2017). Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 261–274. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.12.017

- Stellato, A. C., Flint, H. E., Widowski, T. M., Serpell, J. A., & Niel, L. (2017). Assessment of fear-related behaviours displayed by companion dogs (*Canis familiaris*) in response to social and non-social stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, *188*, 84–90. doi: 10.1016/j.applanim.2016.12.007
- Talló, O. (2016). *Hair cortisol in cattle as a measure of long-term adrenal activity* (PhD Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Tanaka, A., Wagner, D. C., Kass, P. H., & Hurley, K. F. (2012). Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *240*(5), 570–576. doi: 10.2460/javma.240.5.570
- Tinbergen, N. (1951). *The Study of Instinct*. New York: Oxford University Press.
- Tomkins, S. S. (1962). *Affect, imagery, consciousness*. New York: Springer.
- Travain, T., Colombo, E. S., Heinzl, E., Bellucci, D., Previde, E. P., & Valsecchi, P. (2015). Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, *10*(1), 17–23. doi: 10.1016/j.jveb.2014.11.003
- Van Rooy, D., Arnott, E. R., Thomson, P. C., McGreevy, P. D., & Wade, C. M. (2018). Using an owner-based questionnaire to phenotype dogs with separation-related distress: Do owners know what their dogs do when they are absent? *Journal of Veterinary Behavior*, *23*, 58–65. doi: 10.1016/j.jveb.2017.10.009
- Virga, V. (2003). Behavioral dermatology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *33*(2), 231–251. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00102-x
- Walker, D. L., Miles, L. A., & Davis, M. (2009). Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*(8), 1291–1308. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.06.022
- Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(6), 1073–1086. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002

- Westgarth, C. (2016). Why nobody will ever agree about dominance in dogs. *Journal of Veterinary Behavior, 11*, 99–101. doi: 10.1016/j.jveb.2015.02.004
- Wiedenmayer, C. P. (2009). Plasticity of defensive behavior and fear in early development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 33*(3), 432–441. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.11.004
- Wiepkema, P.R., & Koolhaas, J.M. (1993). Stress and animal welfare. *Animal Welfare, 2*(3), 195–218.
- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1963). Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. *Journal of Neurophysiology, 26*(6), 978–993. doi: 10.1152/jn.1963.26.6.978
- Wynne, C. D. L. (2007). Anthropomorphism and its discontents. *Comparative Cognition & Behavior Reviews, 2*, 151-154. doi: 10.3819/ccbr.2008.20013
- Xue, Y. X., Luo, Y. X., Wu, P., Shi, H. S., Xue, L. F., Chen, C., ... Lu, L. (2012). A memory retrieval-extinction procedure to prevent drug craving and relapse. *Science, 336*(6078), 241–245. doi: 10.1126/science.1215070
- Yehuda, R., Engel, S. M., Brand, S. R., Seckl, J., Marcus, S. M., & Berkowitz, G. S. (2005). Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the World Trade Center attacks during pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90*(7), 4115–4118. doi: 10.1210/jc.2005-0550

CONCLUSIONES

La investigación realizada a lo largo de esta tesis nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

Objetivo específico 1:

Examinar las respuestas conductuales y fisiológicas de los perros inducidas por la exposición a una situación estresante basada en la aplicación de un estímulo sonoro intenso de manera repetida.

Conclusión 1: La dependencia de solo medidas conductuales puede arrojar resultados ambiguos o inespecíficos, lo que complica su interpretación. Por tanto, es recomendable combinar los parámetros de comportamiento con valoraciones fisiológicas que permitan un análisis más claro.

Objetivo específico 2:

Evaluar el efecto de la predictibilidad sobre las respuestas defensivas comportamentales y fisiológicas consecuencia del estrés derivado de la aplicación de un estímulo aversivo.

Conclusión 2: Los estudios que investigan los efectos de la predictibilidad sobre las respuestas conductuales y fisiológicas pueden ser complejos a nivel experimental. En este sentido, es fácil que se produzca una adaptación en los modelos de estrés crónico que utilizan estímulos aversivos agudos e intermitentes. Además, la predictibilidad es un concepto con múltiples dimensiones cuya manipulación en mayor o menor medida puede condicionar los resultados obtenidos.

Objetivo específico 3:

Analizar la influencia de una serie de factores individuales y ambientales en la concentración de cortisol en el pelo.

Conclusión 3: En el caso de la presente tesis el color del pelo tuvo una influencia significativa, lo cual sugiere que es necesario considerarlo. Por su parte, el análisis de la concentración de cortisol y de las características individuales de los animales, tales como la edad y el sexo, así como de la composición del grupo social y de las condiciones de alojamiento, no reflejó una relación significativa. Sin embargo, una revisión de la bibliografía respecto a este tema arrojó resultados completamente contradictorios.

Objetivo específico 4:

Estudiar las diferencias en los niveles de cortisol en pelo entre individuos que muestran cambios de comportamiento relacionados con el estrés en comparación con aquellos que no los presentan.

Conclusión 4: Los niveles de cortisol en pelo podrían reflejar las diferencias entre individuos que muestran cambios de comportamiento relacionados con el estrés en comparación con aquellos que no los presentan, pero se necesita una mayor investigación al respecto.

Objetivo específico 5:

Valorar el uso potencial de la determinación del cortisol en pelo para evaluar el éxito de las estrategias dirigidas a reducir el estrés dentro de los protocolos de tratamiento habituales.

Conclusión 5: La valoración de los niveles de cortisol en pelo no parece que represente un método adecuado para analizar el éxito de las intervenciones habitualmente utilizadas para reducir el estrés en los gatos dentro del contexto de los problemas de comportamiento.

Objetivo específico 6:

Revisar la terminología empleada en la ciencia del comportamiento animal y en la etología clínica y plantear las consecuencias que se pueden generar como consecuencia de la extendida presencia del antropomorfismo en estas áreas.

Conclusión 6.1: La ciencia del comportamiento y la etología clínica sufren una importante falta de estandarización. Por un lado, hay una gran variabilidad en los parámetros de comportamiento utilizados dentro de los contextos defensivos, lo cual no facilita la comparación entre trabajos. Por otro lado, incluso dentro de los mismos parámetros se manejan definiciones diferentes, como, por ejemplo, en el caso del *freezing*. Además, concretamente el uso en la bibliografía revisada de los términos miedo y ansiedad es muy inconsistente.

Conclusión 6.2: Gran parte de la terminología empleada incorpora interpretaciones del comportamiento en lugar de ser meros descriptores. Asimismo, muchas de las palabras forman parte del lenguaje vulgar. Esto, sumado al fuerte antropomorfismo que existe en la ciencia del comportamiento animal, facilita la extrapolación de los resultados de las medidas comportamentales y fisiológicas a posibles experiencias conscientes. Este tipo de atribuciones no favorece precisamente el avance en la ciencia del bienestar animal y puede conllevar riesgos en cuanto a la convivencia con los animales domésticos.

Conclusión 6.3: Es importante no precipitarse en las conclusiones al analizar el comportamiento de los animales. En este aspecto, conviene valorar siempre la posibilidad de explicaciones alternativas que impliquen procesos cognitivos diferentes a los que por defecto parecemos otorgarles por analogía con el comportamiento humano.