



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

¿PREFIEREN LAS HEMBRAS DEL CABALLO DOMÉSTICO (*Equus caballus*) LOS OLORES CONTENIDOS EN EL SUDOR DE “SU MACHO PREFERIDO”?

Tesis para obtener el título de
LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

MAGALY EUZABIAGA ALARCÓN

DIRECTORA: DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA

JULIO 2022



Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por haberme brindado la oportunidad de concluir con este proyecto y por la orientación recibida para mejorar los conocimientos durante esta investigación. También le agradezco el apoyo recibido por su parte para lograr mi participación en el XXI Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta, en el Estado de Tlaxcala. Así mismo por la paciencia y comprensión que me demostró durante todo el proyecto a pesar de los inconvenientes.

Al MVZ Certificado Manuel Eduardo Morones Soto, de la Unidad de Policía Metropolitana Montada, Secretaría de Seguridad Pública, de la Ciudad de México, por las facilidades en el uso de sus instalaciones y animales para llevar a cabo este trabajo. Así como a todo el personal y estudiantes de dicha Unidad por su valiosa ayuda con el manejo de los animales.

Al Dr. José Alfredo Zepeda Zempoaltecatl y al Dr. Octavio Sánchez García por su apoyo con el análisis estadístico.

A mi familia, mis hermanos Malu, Javier y Dilan, mis compañeros de toda la vida. Y a mis abuelos, Lourdes Reyes y Juan Euzabiaga, por sus consejos y motivaciones.

A Lalo, por permanecer siempre a mi lado sin importar las adversidades, por su cariño, consejos, comprensión y apoyo incondicional a manos llenas. Y a su familia, la señora Olivia Reyes y Nayeli, por también brindarme su apoyo incondicional, Gracias.

A mis amigos de la universidad, Ricardo Vera, Marisol Vázquez, Gustavo Arellano, Gabriela Pineda, María Córdoba, Carlos Sosa y Diego Argüelles, por las materias compartidas, compañeros de equipo y salidas a campo que no olvidaré, por ellos la universidad se hizo muy agradable y un lugar en donde se compartió más que conocimiento.

Dedicatoria

A mi madre

Guillermina Alarcón Rosas.

La mujer que me inspiró desde niña para tomar este camino, con todas aquellas anécdotas contadas; por demostrarme su amor y profundo cariño. Por enseñarme la fortaleza y la perseverancia por muy difícil que parezca el camino.

Gracias mamá.

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	4
2.1 Comunicación Química en Mamíferos	5
2.1.1 El sistema olfativo de los mamíferos	7
2.1.2 Flehmen.....	14
2.2 Olores sociales y elección femenina de pareja	15
3. Antecedentes	18
3.1 Olores sociales en los equinos	18
3.2 Elección femenina de pareja en el caballo doméstico	23
4. Hipótesis	33
5. Objetivo General	34
5.1 Objetivos específicos.....	34
6. Metodología	34
6.1 Animales.....	34
6.2 Sitio de estudio	35
6.3 Procedimiento experimental I: Determinación de los machos “Preferido” y “No preferido” de cada yegua	35
6.3.1 Análisis estadístico de los datos I	38
6.4 Procedimiento experimental II: Discriminación del sudor de los machos “Preferido” y “No preferido” por parte de las yeguas	39
6.4.1 Análisis estadístico de los datos II	41
7. Resultados	41
7.1 Descripción del comportamiento de las yeguas en presencia de los machos	41
7.2 Determinación de las preferencias de las yeguas.....	45
7.3 Comportamiento de las hembras en respuesta al sudor de los machos ...	51
7.4 Preferencia de sudor de machos “Preferido” y “No preferido”	52
8. Discusión	55
9. Conclusión	56
10. Referencias	57

1. Resumen

Las yeguas en estro muestran preferencia por machos particulares que se correlaciona con la tasa de vocalización del macho. Los caballos poseen diversas fuentes de olores que pueden tener alguna función biológica como el sudor, que es producido en grandes cantidades. El sudor del caballo contiene proteínas como albúmina y globulina, así como cloro, magnesio, sodio, potasio, ácidos fosfórico y sulfúrico. Aunque no se ha demostrado que estos componentes tengan alguna función biológica en la comunicación química de esta especie. En el caballo se ha identificado la proteína EquC1, abundante en el sudor. Esta proteína es una lipocalina que puede ser acarreadora de feromonas en esta especie. Estas lipocalinas pueden capturar y liberar paulatinamente olores del sudor de los machos, que las hembras pueden utilizar en la elección femenina de pareja. El objetivo de este estudio fue investigar si las hembras podían discriminar entre el olor del macho preferido *versus* el no preferido. Se utilizaron 12 yeguas y 6 sementales. Las yeguas mostraron preferencia por un macho en particular, pasaron más tiempo con éste y desplegaron conducta de estro. En la última de cuatro pruebas de preferencia de olores, las yeguas olfatearon más el olor de su macho Preferido en comparación con el agua destilada y el macho No Preferido.

2. Introducción

Los animales han desarrollado diferentes estrategias de comunicación para atraer una pareja o para diferenciar el estatus social, la comunicación química en especial involucra el intercambio de información, la emisión y detección de señales y pistas químicas, como las feromonas, que proveen a los individuos la información de otros individuos.

El término *feromona* fue usado por primera vez por Karlson & Lüscher en 1959; el nombre deriva del griego *Pherein*, que significa transferir; y *hormone*, excitar. Una feromona es definida como una sustancia secretada al exterior por un individuo, y detectada por uno de la misma especie; con el cual se relaciona

generando una respuesta específica. Wilson en 1963 hace una distinción entre dos clases de feromonas, las feromonas liberadoras son aquellas que inducen una conducta inmediata como la agresión o una conducta de apareamiento; y aquellas que provocan cambios fisiológicos y hormonales en el organismo, son llamadas feromonas modificadoras. Por lo tanto, las feromonas se diferencian de otros tipos de sustancias químicas (esencias florales, olores de alimentos o repelentes) y, sobre todo, que solo logran su efecto entre individuos pertenecientes a la misma especie (co-específico), y en dado caso entre especies muy relacionadas (Karlson & Lüscher, 1959).

Las feromonas funcionan como señales que provocan procesos neuronales en diversas áreas del cerebro, permitiendo cambios marcados en la conducta animal y el estado endocrino, que siempre han sido usadas por diversos animales (Dulac & Torello, 2003). Estas feromonas pueden ser liberadas al ambiente a través de diversas fuentes, localizadas en el cuerpo según la especie; estas feromonas pueden ser detectadas por receptores ultrasensibles que reciben la señal y provocan respuestas conductuales como rituales de apareamiento, el marcaje del territorio o la identificación de sus colonias, por ejemplo, la hembra en estro del hámster dorado, deja marcas de sus secreciones vaginales en el ambiente, anunciando su receptividad sexual a los machos de su especie (Johnston, 1977; 1979), a su vez, el hámster macho muestra altos niveles conductuales de cópula cuando el olor de un hembra hámster está presente, pero declinan su comportamiento cuando la fuente de olor es removida del lugar (Johnston, 1986). En otro ejemplo, el castor produce dos tipos de señales odoríferas, la *Castoreum* está involucrada en el marcaje de su territorio y media la precognición entre los miembros de su familia, y las secreciones de las glándulas anales, provén información sexual e individual (Sun & Muller-Schwarze, 1999).

2.1 Comunicación Química en Mamíferos

Los mamíferos, la mayoría de ellos con sistemas sociales complejos, utilizan también la comunicación química para intercambiar información. Diversas señales y pistas química son, fundamentales para poder reconocer a los individuos de su

misma especie, establecer relaciones dentro de sus grupos sociales y reconocer a los miembros de su manada, o de la familia a la que pertenecen; reconocer la edad, identificar el sexo, mostrar la oportunidad de apareamiento y poder elegir a una pareja, así como identificar otros estados fisiológicos como la lactancia o la gestación con base al olor. Para esto, los mamíferos pueden detectar y distinguir una gran variedad de sustancias no volátiles, provenientes de otros individuos, cuyas moléculas varían en tamaño, forma, grupo funcional y carga (Beets, 1970); dichas señales odoríferas están contenidas en la orina, heces y secreciones de diversas glándulas cutáneas y pueden ser depositadas en el ambiente por medio de conductas de marcaje odorífero (Johnson, 1973; Brown & MacDonald, 1985), o bien, simplemente ser emitidas. Como ocurre en el caso del conejo adulto doméstico y silvestre, que realiza el marcaje olfativo para delimitar su territorio, por medio de la orina y heces cubiertas por secreciones de sus glándulas anales (Mykytowycz & Gambale, 1969); y en otros estudios por medio de secreciones de sus glándulas submandibulares, realiza el marcaje por frotamiento del mentón en la entrada de madrigueras, plantas, raíces y heces de otros conejos (Mykytowycz, 1965).

Los mamíferos liberan en el ambiente feromonas, con las que los integrantes dentro de su grupo pueden responder mediante conductas estereotipadas. Uno de los ejemplos mejores estudiados es, la feromona del pezón del conejo, identificada por ser una única molécula 2-metilbut-2-enal (Schaal et al. 2003), presente en la leche materna de la coneja, que es detectada por parte de las crías a través de su olfato, e induce la búsqueda estereotipada del pezón, logrando una rápida localización del mismo (Distel & Hudson, 1985), por lo que esta conducta resulta vital para la alimentación durante los primeros días de supervivencia para los gazapos.

Las glándulas cutáneas son una de las fuentes de olores implicadas en la producción y emisión de dichas señales químicas. Las glándulas cutáneas exocrinas, vierten sus productos de secreción por medio de un sistema de conductos, y son principalmente de dos tipos: sudoríparas y sebáceas. Una glándula sudorípara ecrina consiste en un tubo secretor enroscado dentro de la dermis y un

conducto se dirige directamente a la superficie de la piel, se encuentran en la nariz de los cerdos y el hocico de los conejos. Las glándulas sudoríparas apocrinas también consisten en un conducto cuya porción enroscada interna esta embebida en la dermis, pero su otra porción es un conducto que lleva la secreción al folículo piloso, son glándulas comunes entre los mamíferos, encontradas por toda la piel de carnívoros, bovinos y equinos. Las glándulas sebáceas holocrinas secretan su contenido directamente en los folículos pilosos a los que están asociadas y están presentes en la piel de todos los mamíferos excepto cetáceos, se encuentran por ejemplo en la piel del hocico, en el meato auditivo externo y en el área anogenital (Albone & Shirley, 1984). Las señales químicas son percibidas por el sistema olfativo.

2.1.1 El sistema olfativo de los mamíferos

Este sistema es el responsable de detectar estímulos químicos provenientes del medio ambiente en contextos diferentes, como las sustancias peligrosas, el alimento y los asociados con las interacciones sociales (Ma, 2007). El sistema olfativo de los mamíferos se ha estudiado principalmente en los roedores. Se han descrito dos sistemas olfativos cuyas estructuras son anatómicamente paralelas, el Sistema Olfativo Principal y el Accesorio o Vomeronasal. El olfato de los mamíferos posee una enorme capacidad quimiosensorial que puede deberse a que posee subsistemas olfativos (Breer et al. 2006). Las funciones de los sistemas olfativos principal y accesorio o vomeronasal se complementan con otros tres subsistemas, las terminaciones nerviosas intranasales del nervio trigémino, el órgano septal o de Masera y el ganglio de Grueneberg (Mamasuew et al. 2011, Mucignat-Caretta et al. 2012; Figura 1).

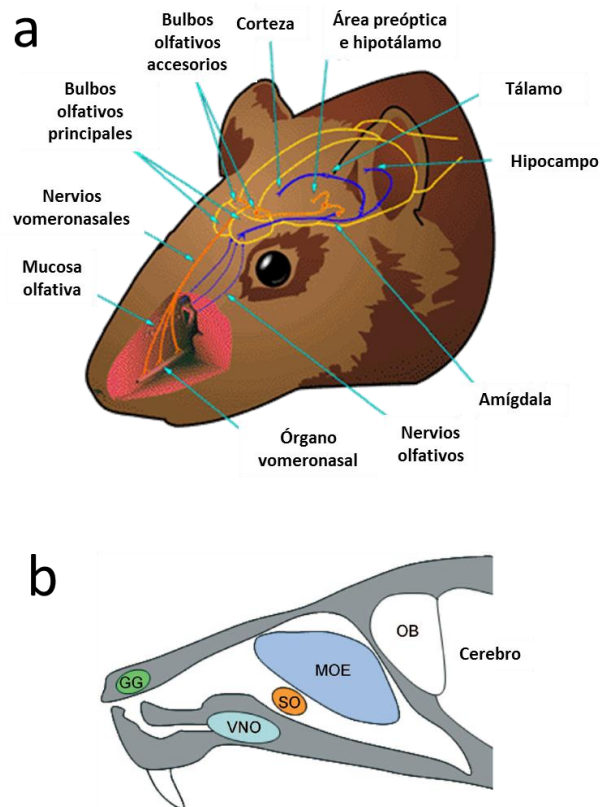


Figura 1. a) Vía olfativa principal y accesoria o vomeronasal (modificada de Michael Meredith); b) GG: ganglio de Grueneberg, VNO: órgano vomeronasal, SO: órgano septal o de Masera, MOE: epitelio olfativo principal, OB: bulbo olfativo (modificado de Fleischer y Breer, 2010).

La detección de moléculas ocurre en los epitelios olfativos principal (cavidad nasal) y accesorio o vomeronasal (órgano de Jacobson o vomeronasal), de donde parten proyecciones nerviosas primarias a los bulbos olfativos en el cerebro. En los roedores se ha descrito la conectividad diferente y paralela de los sistemas olfativos principal y vomeronasal, que son adyacentes y que envían sus proyecciones a áreas en la corteza que no se superponen, ello constituye la piedra angular sobre la que se basa la hipótesis olfativa dual (Scalia & Winans, 1975). Sin embargo, se han reportado interacciones complejas entre ambos sistemas tanto a nivel anatómico como funcional (Martinez-Marcos, 2009, Mucignat-Caretta et al. 2012). Por ejemplo, los compuestos volátiles parecen ser percibidos tanto por el epitelio olfativo como por el vomeronasal (Trinh & Storm, 2003), los bulbos olfativos principales y

vomeronasales se activan simultáneamente tanto por olores como por compuestos feromonales (Xu et al. 2005).

El epitelio olfativo principal está formado por neuronas receptoras olfativas, que tienen grandes cilios densos y entrelazados en la mucosa nasal y las glándulas de secreción (Bertmar, 1981; Kratzing, 1971). Estas neuronas olfativas proyectan sus axones y convergen en un único glomérulo en ambos lados del bulbo olfativo principal (BOP) (Shepherd, 1988; Mombaerts et al. 1996), este glomérulo recibe la entrada de un solo tipo de receptor y es la unidad fundamental para el procesamiento de los olores (Buck, 1996; Rodriguez et al. 1999; Firestein, 2001). Pues el procesamiento odorífero fluye hacia el BOP, donde las células son activadas por pequeñas moléculas de olores, y hacia el núcleo, es donde las neuronas muestran más capacidad de respuesta a mezclas de olores o a componentes únicos (Lie et al. 2006), de esta manera se puede formar en el BOP un mapa de la identidad del olor (Choi et al. 2011). Posteriormente las proyecciones del BOP son distribuidas hacia la base del cerebro, incluyendo al núcleo olfativo anterior, tubérculo olfativo, corteza piriforme, corteza entorrinal, núcleo del tracto olfativo, y al núcleo anterior, central y posterior-lateral de la amígdala (Johnston, 2000; Wysocki & Meredith, 1987), áreas involucradas en la percepción de los olores, produciendo diversas respuestas emocionales y motivacionales (Shepherd, 1988).

El sistema vomeronasal recibe su nombre por el órgano vomeronasal (OVN), que fue descrito por L. Jacobson en 1813 (Trotier & Doving, 1998). Su descripción en diversos mamíferos dio como resultado la asociación de su nombre con este órgano. Es una estructura bilateral, alargada, tubular y aplanada, localizada medialmente en o sobre el septum nasal, su tamaño varía considerablemente entre los órdenes de mamíferos, así como la localización de su abertura. En algunas especies, por ejemplo, los roedores, su conducto se abre dentro de la cavidad nasal, en otras especies como los gatos, se abre en el canal nasopalatino y en otras como los bovinos el conducto se abre directamente en la cavidad oral (Wysocki, 1979).

Se han descubierto alrededor de 250 a 300 genes en el tejido olfativo del OVN que codifican para proteínas receptoras, éstas son expresadas por las

neuronas sensoriales vomeronasales en diferentes zonas del tejido vomeronasal (Herrada & Dulac, 1997). Las V1r son una clase de receptores acoplados a proteínas-G, que comprenden alrededor de 137 receptores funcionales (Adler et al. 2000), expresados por los cuerpos celulares ubicados en la zona apical del epitelio vomeronasal (Dulac & Axel, 1995). Dichos receptores pueden clasificarse en 12 familias diversas, sugiriendo que éstos responden a una gran variedad de ligandos diferentes (Rodríguez et al. 2000). Las V2r, son otra clase de receptores acoplados a proteínas-G que difieren estructuralmente de las V1rs, por presentar un grupo amino terminal extracelular, y se ha estimado que contienen alrededor de 100 receptores funcionales, también expresados por las neuronas sensoriales vomeronasales localizadas en la zona basal del epitelio vomeronasal (Herrada & Dulac, 1997).

El OVN conecta con la amígdala (Winans & Scalia, 1970; Scalia & Winans, 1975) y provee información feromonal hacia el hipotálamo, provocando respuestas conductuales y efectos neuroendocrinos, pues las neuronas vomeronasales sensoriales proyectan sus axones desde el OVN al bulbo olfativo accesorio (BOA), a través de la placa cribiforme del hueso etmoides en la base del cráneo (Licht & Meredith, 1987). Es así como las células receptoras que expresan el gen V1r proyectan de 10-30 glomérulos a la parte anterior (rostral) del BOA (Belluscio et al. 1999; Rodríguez et al. 1999), mientras que las células receptoras que expresan el gen V2r proyectan de 6-10 glomérulos en la parte posterior (caudal) del mismo (Del Punta et al. 2002), por lo que estos dos tipos de proyecciones axónicas diferenciadas anatómicamente, sugieren que los distintos tipos de estímulos vomeronasales son procesados de manera separada en las sub-regiones del BOA (Halpern et al. 1998).

Posteriormente el BOA se conecta con las estructuras anatómicas que incluyen al núcleo de la estría terminal, el núcleo del tracto olfativo accesorio y al núcleo medial y posterior-medial de la amígdala, la cual está involucrada en la modulación de conductas de miedo y ansiedad, así como con conductas reproductivas y agresivas (Martinez-Garcia *et al.* 2008); después la amígdala se

conecta con el tubérculo olfativo y al islote de Calleja, los cuales están involucrados presumiblemente en la comunicación feromonal (Lanuza et al. 2008). A continuación, las proyecciones llegan a tres áreas del hipotálamo: el área preóptica, el hipotálamo ventromedial y el núcleo premamilar (Johnston, 2000; Wysocki & Meredith, 1987; Swanson & Petrovich, 1998; Dulac & Torello, 2003), áreas del cerebro involucradas en la regulación de conductas agresivas o reproductivas, encargadas del control de las hormonas liberadas por la glándula pituitaria (Licht & Meredith, 1987; Dulac & Torello, 2003).

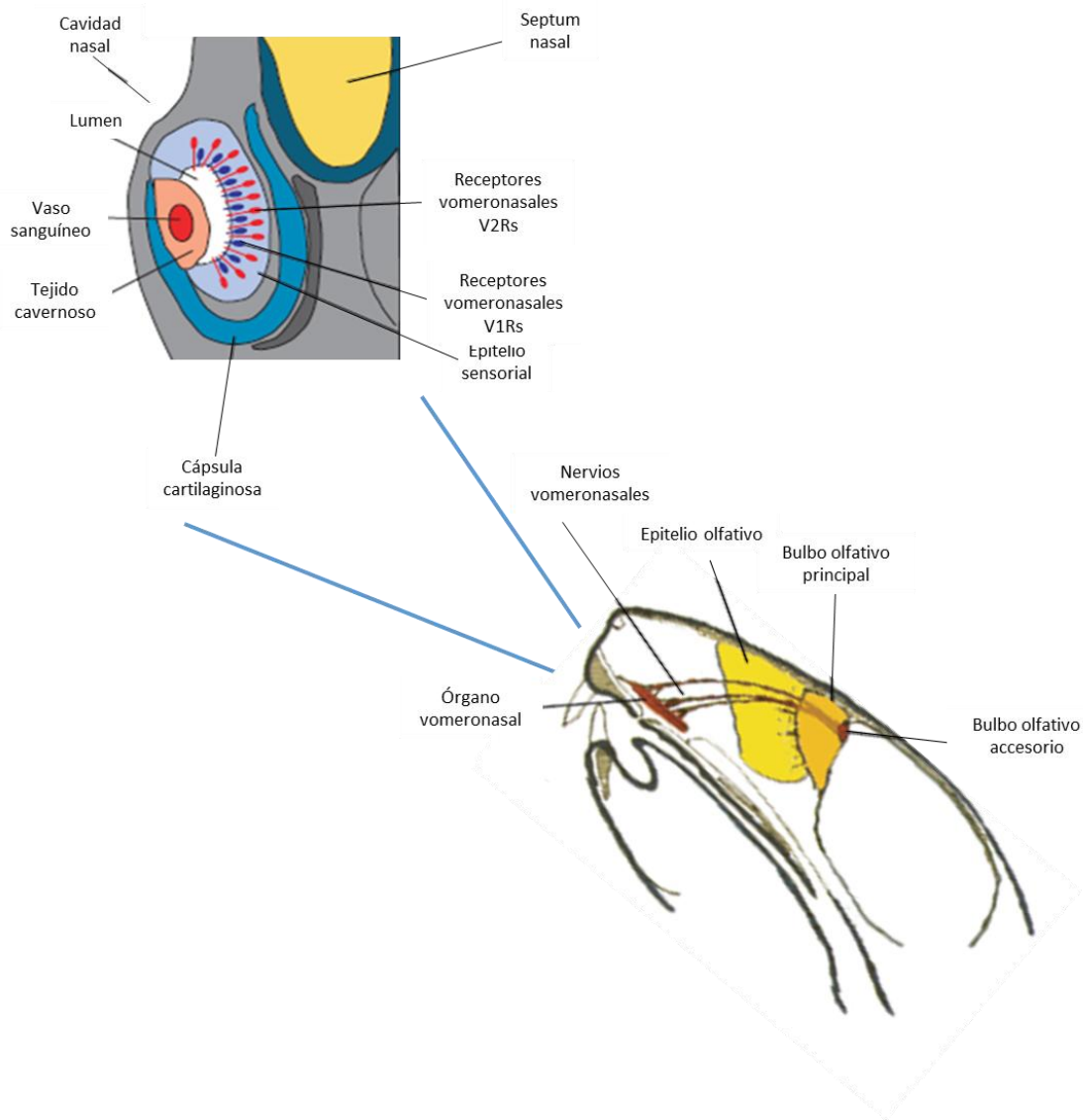


Figura 2. Órgano vomeronasal en roedores. Abajo: esquema de una vista sagital de la cabeza de un roedor que muestra la localización del órgano vomeronasal en relación con el epitelio olfativo principal. Arriba: diagrama de una sección coronal del órgano vomeronasal, encerrado en una cápsula cartilaginosa. El epitelio sensorial contiene neuronas vomeronasales sensoriales. Los cambios en el flujo de los vasos sanguíneos localizados lateralmente, cambian el volumen del lumen y los estímulos entran y salen por bombeo (modificado de Brennan & Keverne, 2004).

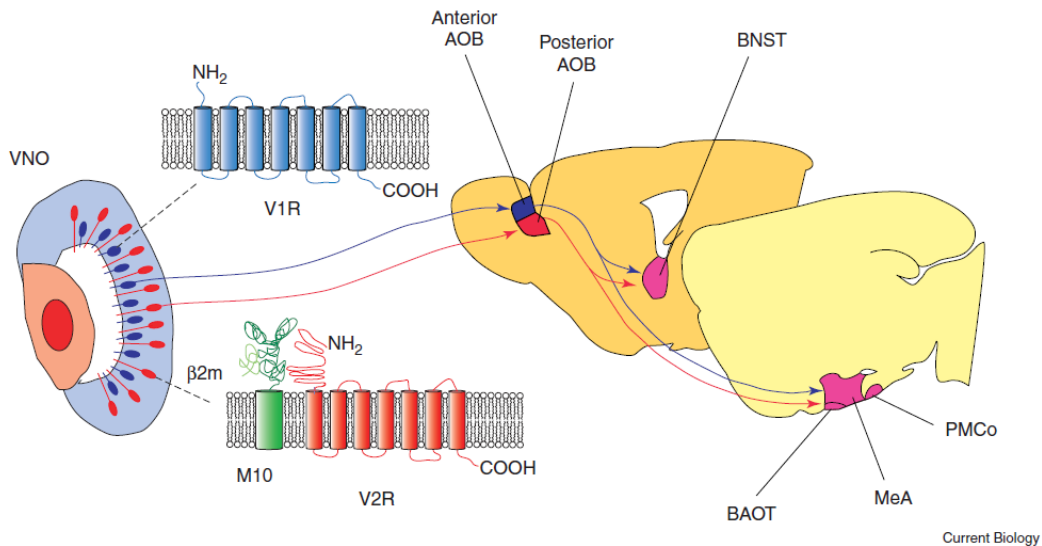


Figura 3. Vías neuronales del procesamiento vomeronasal. Los V1r son una clase de receptores acoplados a una proteína-G (en azul), que proyectan hacia la sub-región anterior del bulbo olfativo accesorio (AOB en azul). Las V2r difieren de las V1r, por presentar un grupo amino extracelular (en rojo), que proyectan hacia la sub-región posterior del bulbo olfativo accesorio (AOB en rojo). La información de las V1r y V2r es procesada de manera separada en el bulbo olfativo accesorio, pero las proyecciones convergen solapadas hacia el núcleo de la estría terminal (BNST), al núcleo del tracto olfativo accesorio (BAOT), a la amígdala medial (MeA) y al núcleo cortical posterior-medial de la amígdala (PMCo) (Brennan & Keverne, 2004).

Otra característica anatómica del OVN entre algunos mamíferos, es la ausencia del ducto nasopalatino, una abertura que conecta la cavidad nasal con la cavidad oral, pero en otras especies sí está presente dicho conducto sin obstrucciones entre la boca y la nariz, cuyo mecanismo de inhalaciones permite la entrada a señales químicas no volátiles hacia este órgano (Estes, 1972), después del contacto directo del hocico con la fuente del compuesto químico olfatorio.

La función primordial del OVN en los mamíferos es actuar como un quimiorreceptor encargado principalmente en detectar las feromonas sexuales o sus derivados, y está involucrado como tal en la detección del estro, liberación, control y coordinación de la actividad sexual (Estes, 1972). También detecta feromonas de alarma (Kiyokawa et al. 2007), función que comparte con el ganglio de Grueneberg (Brechtbühl et al. 2008), percibiendo señales químicas dejadas por depredadores (Masini et al. 2010). Las neuronas vomeronasales responden a moléculas urinarias de bajo peso molecular (Del Punta et al. 2002) y feromonas volátiles (Leinders-Zufall et al. 2000), principalmente por la activación de los receptores V1r (Boschat et al. 2002), sin embargo también responden a sustancias no volátiles como esteroides (Nodari et al. 2008) y proteínas como las lipocalinas (Krieger et al. 1999), péptidos excretados por glándulas exocrinas (Kimoto et al. 2005) o también podrían responder a péptidos de bacterias o relacionados con el sistema inmune (Liberles et al. 2009).

El ingreso de dichas sustancias al OVN es por medio de un acceso especial, pues los estímulos dependen de un mecanismo de bombeo vascular que se activa en situaciones de novedad (Meredith & O'Connell, 1979; Meredith, 1994), pues los estudios realizados con el hámster dorado, revelaron que cuando la presión sanguínea es alta el OVN se comprime, cuando la presión arterial baja éste se expande y se produce la succión de moco con los productos químicos disueltos en éste (Meredith, 1980; 1991; Meredith et al. 1980 citado en Johnston & del Barco-Trillo, 2009). Algunos estímulos resultan ser de naturaleza no volátil como por ejemplo las feromonas acarreadas por lipocalinas (péptidos mencionados anteriormente) presentes en orina, secreciones vaginales y secreciones de glándulas salivares; así, estos estímulos llegan al OVN por contacto físico (Luo et al. 2003) y comportamientos específicos como la respuesta de Flehmen, que facilita la entrada de dichos estímulos en este órgano.

2.1.2 Flehmen

El flehmen es una respuesta conductual desplegada entre algunos mamíferos, pues se ha correlacionado los efectos de las feromonas en la reproducción con la respuesta de flehmen tanto en animales silvestres como domésticos, así como con la forma en que se comunica el órgano vomeronasal ya sea con la cavidad oral o nasal. Esta conducta es observada en ungulados y felinos. Estes (1972) describe la respuesta de flehmen de la siguiente forma, el animal permanece con la boca abierta, la cabeza extendida y elevada, mientras su labio superior es retraído, arrugando la nariz y descubriendo la encía superior (Figura 4).

Durante el flehmen la respiración no es primordial, pues su principal función es probablemente el análisis de la orina, mediante la estimulación del órgano vomeronasal (Dagg & Taub, 1970; Estes, 1972). Por ejemplo, en el caballo doméstico, se describe vigorosas inhalaciones y exhalaciones antes del flehmen (Schneider, 1930) pues el ducto nasopalatino del órgano vomeronasal no está abierto hacia la cavidad oral, por lo cual las sustancias volátiles pueden ser tomadas por aspiración (Schummer et al. 1979; Lindsay & Burton, 1983); de tal manera que en algunas especies, la dirección y velocidad del flujo del aire que entra y sale de la cavidad nasal está controlada por los músculos rostrales, en especial cuando el labio superior es retraído bloquea la salida de las sustancias volátiles; siendo observado también en el gato y el antílope (Estes, 1972). En otras especies, el ducto nasopalatino se abre a la cavidad oral, y por inhalación llevan el flujo del aire al órgano vomeronasal e incluso la lengua ayuda a llevar dichas sustancias directamente a los ductos nasopalatinos (Estes, 1972). Por ejemplo, en las cabras el flehmen es desplegado para acarrear sustancias de la boca al órgano Vomeronasal (Ladewig & Hart, 1980). Sin embargo, Wysocki & colaboradores (1980) han demostrado la transferencia de sustancias no volátiles en el cobayo especie que presenta la abertura del ducto nasopalatino hacia la boca.

El órgano vomeronasal a pesar de ser un accesorio que facilita la detección de feromonas, hay especies en las cuales, los músculos rostrales controlan la abertura y cierre de las narinas externas, sin la necesidad de recurrir a la retracción

del labio superior, esto explicaría por qué en algunas especies el flehmen está ausente, como en cerdos, la mayoría de los carnívoros y primates. Ciertamente la respuesta del flehmen no ocurre en todos los mamíferos, la mueca del flehmen varía entre las especies, siendo más pronunciado en especies donde los labios y nariz son más móviles como en el antílope, caballos y el ñu, en contraste con la gacela simplemente abre la boca ligeramente (Estes, 1972).

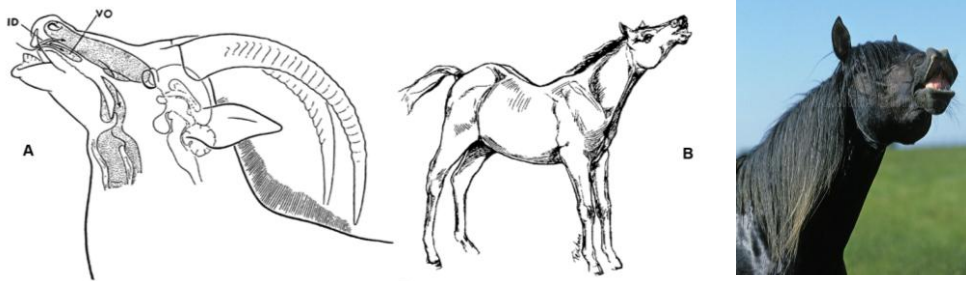


Figura 4. Respuesta conductual de flehmen en mamíferos. A) Paso de sustancias volatiles por la boca, conducidas a través de los ductos nasopalatinos (ID), para llegar al órgano vomeronasal (VO) (Estes, 1972). B) Respuesta de Flehmen en el caballo doméstico (Crowell-Davis & Houpt, 1985). Foto ID 196313047 (<https://www.dreamstime.com/lusitano-horse-stallion-flehmen-image196313047>).

2.2 Olores sociales y elección femenina de pareja

Un ejemplo de señales químicas que modifican la conducta reproductiva de las hembras, son los derivados de andrógenos contenidos en altas concentraciones en la saliva de los machos sexualmente maduros del cerdo (*Sus scrofa*), estos derivados contienen componentes con efectos feromonales que atraen a las hembras que se encuentran en fase del estro y se presentan receptivas ante el macho durante la cópula (Dorries et al. 1997); estos atrayentes sexuales son producidos en los testículos y transportados por el torrente sanguíneo a las

glándulas salivales submaxilares, donde son acarreados por la lipocalina feromoneína al medio ambiente (Booth, 1984).

Otro ejemplo, son los componentes volátiles presentes en la orina del macho del ratón adulto (*Mus musculus*), que producen cambios fisiológicos en las hembras, aceleran la madurez sexual en hembras juveniles, inducen el estro en las hembras adultas y sincronizan sus ciclos de estro (Jemiolo et al. 1986). Un efecto similar ocurre en las hembras de las cabras (*Capra hircus*) y borregos (*Ovis aries*), cuando se exponen a la presencia de machos, se desencadena la secreción de la hormona luteinizante durante el estro y ocurre la sincronización de la ovulación, a dicho fenómeno se denomina “efecto macho” (Gelez & Fabre-Nys, 2004). En *Bos indicus* y *Bos Taurus*, la presencia de un toro o la exposición de sus olores a las vaquillas, también aceleró el inicio de la pubertad en el 67% de las vaquillas que fueron expuestas, apoyando la hipótesis de que la orina del toro macho contiene feromonas responsables del aceleramiento en la pubertad (Rekwot et al. 2001; Iwata et al. 2003; Izard & Vandenbergh, 1982).

Los gatos exhiben conductas de marcaje con orina depositada en forma de rocío sobre objetos (Bradshaw & Cameron-Beaumont, 2000), pues se ha encontrado que en la orina del gato doméstico (*Felis silvestris catus*) y de otros miembros de la familia Felidae, el aminoácido felinina (2-amino-7-hidroxi-5,5-dimetil-4-ácido tioheptanoico) da el olor característico de la orina de gato, además se piensa que es el precursor de una feromona que puede atraer a las hembras (Hendriks et al. 1995).

Los perros también despliegan conductas de marcaje olfatorio, influenciado por la presencia de otros perros para indicar su dominancia, agresividad y amenaza entre los machos alfa; y las perras marcan con frecuencia sus sitios de dominancia cerca del lugar donde mantienen a sus crías, posiblemente para protegerlos de intrusos de su misma especie (Pal, 2003).

Se ha argumentado que las hembras de mamíferos pueden valorar la calidad de los machos por medio de sus olores, pues existe evidencia de que las hembras

responden a la información contenida en las señales odoríferas de los machos y pueden utilizarlas para elegir una pareja, ya que muestran respuestas fisiológicas y preferencias conductuales en relación con la familiaridad y rango social del macho donador de olor. Por ejemplo, la orina de ratón (*Mus musculus*) contiene componentes que indican a las hembras la presencia de machos potencialmente reproductivos (Schewende et al. 1986); y las hembras eligen como pareja a machos cuyas marcas odoríferas predominan en el sitio (Rich & Hurst, 1999), y no eligen a los machos subordinados (Hurst, 1987). También utilizan el olor mediado por el complejo principal de genes de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés “*major histocompatibility complex*”) para seleccionar machos (Hurst et al. 2001), por ejemplo, en relación a su parentesco genético (Yamazaki et al. 1994; Jordan & Bruford, 1998) y utilizan el olor para distinguir entre machos saludables y enfermos (Penn & Potts, 1998). De igual manera las hembras son atraídas a los machos por medio de sus marcas odoríferas con orina y son capaces de discriminar el olor de un macho parasitado de aquel no parasitado, siendo más atraídas hacia el olor de machos no parasitados (Kavaliers & Colwell, 1995). De igual manera utilizan las marcas odoríferas para comparar el olor de un macho con las marcas previamente encontradas en el ambiente para seleccionar así compañeros de apareamiento (Rich & Hurst, 1998; 1999). Un estudio realizado por Reece-Engel (1988) sugiere los mismos resultados en las hembras del conejo europeo.

Las hembras también pueden dejar señales en el ambiente por medio de la orina, en muchas especies las hembras orinan con más frecuencia conforme entran en fase de estro, por ejemplo, la perra, la cerda, la yegua, la hembra del rinoceronte negro, hembra del tapir malayo, en bovinos, felinos y primates (citados en Estes, 1972; Fraser, 1968; Ewer, 1968; Ternbrock, 1968; Petter, 1965; Michael & Keverne, 1968), cuyo comportamiento de celo deja pistas reconocibles para los machos sobre su disposición de aparearse.

A pesar de los estudios arriba mencionados realizados en mamíferos y de algunas evidencias de la importancia de la comunicación química en su

reproducción, falta explorar mejor este tópico en algunas especies domésticas como el caballo (Guarneros et al. 2020).

3. Antecedentes

3.1 Olores sociales en los equinos

Los equinos se han caracterizado por presentar una organización social muy compleja, McCort en 1984 hace una generalidad y distingue tres tipos de grupos sociales: 1) los harems, 2) grupos múltiples de adultos y 3) los grupos de solteros donde la participación de los olores, tienen un papel fundamental en la conformación de su estructura social, pues el marcaje odorífero es muy común para especies del género *Equus*, (Welsh, 1975; Berger, 1977), por lo que se sugiere que esta conducta puede funcionar como un tipo de comunicación química entre miembros del grupo (Feist & McCullough, 1976).

El harem generalmente está conformado por un macho dominante, uno o pocos machos subordinados, varias hembras adultas y su progenie, formando harems normalmente estables (Salter & Hudson, 1982; Klingel, 1982; Berger, 1986).

Solo un semental domina sobre todos los miembros del harem, se encarga de la protección de las hembras junto con sus crías de posibles amenazas, y defiende su territorio (Feh, 1990). El garañón delimita su territorio, depositando pilas de estiércol que sirven como mensajeros de olores, siendo colocadas en lugares donde las áreas de otros grupos se encuentran cerca o se sobrelapan (Klingel, 1975; Rubenstein, 1981; Salter & Hudson, 1982), también a lo largo de senderos (Salter & Hudson, 1982), pero la mayor densidad de pilas de estiércol puede encontrarse a lo largo de caminos usados por las bandas dirigiéndose a lugares con recursos de agua (Feist & McCullough, 1976). Pues cuando el garañón detecta excretas de otro(s) individuo(s), se acerca, típicamente las olfatea, despliega el flemen, luego orina o defeca sobre las excretas, y vuelve a olfatearlas otra vez antes de retirarse (Welsh, 1973; McCort, 1984), de esta manera los depósitos fecales

funcionan como señales para alertar la presencia de otros sementales y evitar los enfrentamientos entre machos (Miller & Denniston, 1979).

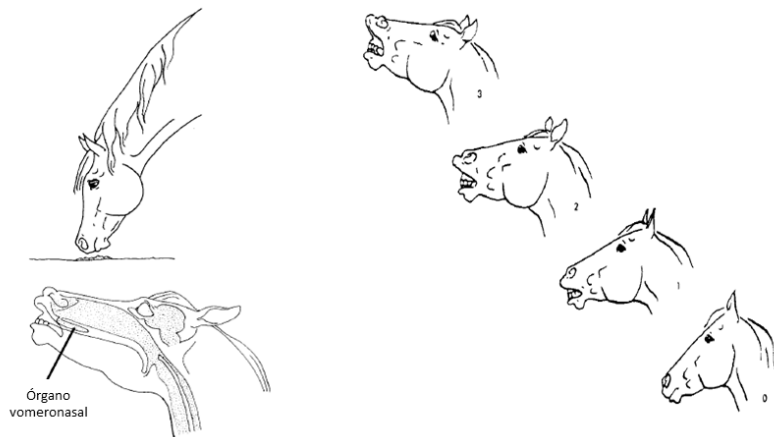


Figura 5. Izquierda: investigación olfativa típica de excretas y órgano vomeronasal involucrado (modificado de Waring 2003). Derecha: secuencia de la expresión de Flemen (modificado de Dark 1975, citado en Waring 2003).

Miller en 1981, encontró en sus estudios realizados en el Desierto Rojo de Wyoming, que el 25% de los encuentros agresivos entre machos involucraron el olfateo y el marcaje con pilas fecales, y el marcaje ocurrió en el 69% de todos los encuentros alrededor de estas pilas. En Alberta, el 62% de todas las interacciones entre machos involucraron depósitos fecales (Salter & Hudson, 1982). Kiley-Worthington en 1987, Rubenstein y Hack, en 1992, observaron que los sementales también examinan y olfatean con frecuencia el estiércol de machos desconocidos durante largos periodos de tiempo, logrando diferenciar el estiércol de miembros de su grupo familiar. Krueger y Flauger (2011), demostraron la habilidad de los caballos para diferenciar sus propias heces de las demás heces de los miembros de su grupo, además de observar que los caballos permanecen más tiempo olfateando las heces

de los caballos de quienes recibieron repuestas agresivas. Sugiriendo que los caballos de ambos sexos logran reconocer a posibles competidores potenciales entre sus compañeros de grupo por los olores presentes en las heces. Feist y McCullough en 1975, reportaron que los sementales que son miembros del mismo grupo de solteros defecan sobre las pilas de estiércol en orden de su rango, del más bajo hasta el más dominante, al igual que en grupos de solteros de Camargue (Wells & Goldschmidt-Rothschild, 1979) y en los grupos de múltiples machos que típicamente defecan en orden de rango (Feist & McCullough, 1976; Miller, 1981).

También se ha encontrado que machos juveniles cerca de los 3 años de edad puede exhibir el marcaje como parte de su repertorio conductual (Hoffmann, 1985), pero la conducta de marcaje es raramente exhibida por yeguas o caballos inmaduros (Turner et al. 1981), sin embargo la eliminación del marcaje de las yeguas ocurre con más frecuencia durante la temporada de la crianza que durante el resto del año (Feist & McCullough, 1976; Turner et al. 1981; Hoffmann, 1985; Kimura, 2001) correlacionada con la temporada con altos niveles de testosterona (Turner & Kirkpatrick, 1986). Durante la temporada de reproducción, los sementales de *E. caballus*, *E. zebra*, *E. bohmi*, y *E. przewalskii* por ejemplo, suelen olfatear con más frecuencia y marcar con su orina las excretas de las yeguas de su propia familia, (Feist & McCullough, 1976; Turner et al. 1981), este tipo de marcaje es realizado para demostrar su presencia en el grupo y enmascarar los olores de las hembras. Estudios realizados por Kimura en el 2001, en el caballo salvaje (*E. caballus*) de la Isla Sable, en la Costa de Canadá, revelaron que, durante la temporada reproductiva, las heces de la yeguas contienen altos niveles de ácidos grasos, y el marcaje del semental por medio de orina contiene altas concentraciones de *p*-cresol, que deposita sobre las heces de la yegua, disminuyendo las concentraciones de ácidos grasos como en los niveles encontrados sobre las heces de yeguas que no se encuentran en estro. Esto, tiene un efecto que enmascara a las heces fecales de las yeguas en estro, con la finalidad de no poder ser distinguidas entre las hembras en anestro para reducir el potencial de atracción por otros machos rivales.

Por el contrario, las yeguas también participan en la comunicación química dejando pistas olfativas, pues los olores contenidos en la orina de las yeguas en fase de estro, aparentemente difieren de los olores de una yegua que no lo está, (Waring et al. 1975; Walther, 1984; Poole, 1985), y estos olores parecen facilitar el interés del caballo por la yegua (Waring, 2003). Marinier y colaboradores en 1988, reportan que, en el caballo doméstico, los sementales pasan mucho más tiempo olfateando las muestras de orina, secreciones vaginales y heces de yeguas, logrando distinguir el olor individual entre hembras, por medio de la orina y las heces fecales, pero no diferencian a las yeguas en fase de estro de otras que no lo están; Weeks y colaboradores (2002), confirman los mismos hallazgos, pero no encuentran diferencias significativas entre la frecuencia de olfateos y la respuesta del flehmen exhibidas por los sementales ante la presencia de una yegua en estro y otra yegua en anestro, sugiriendo que el semental no es capaz de distinguir la condición reproductiva de la yegua por medio de la orina o las heces.

Sin embargo, la detección de las sustancias volátiles en la orina de las yeguas es observada por la respuesta conductual del flehmen, por ejemplo, en el poni Galés, se muestra que el despliegue del flehmen, es muy frecuentemente realizado por los sementales, después de olfatear la orina y heces de yeguas. En los potrillos, el flehmen es practicado desde los dos días de nacimiento hasta la vigésima semana de vida, como parte de su crecimiento y formación hacia su madurez sexual. Las yeguas y potrancas por su parte también responden con el flehmen ante la orina de su propia madre y de otros individuos, pero en menor frecuencia que un semental y los potros; pues los machos muestran ser más sensibles a ciertas sustancias volátiles (Crowell-Davis & Houpt, 1985), contenidas en la orina de las yeguas, presumiblemente detectadas por el órgano Vomeronasal (Estes, 1972).

Por ejemplo, se demuestra que ciertos componentes volátiles en la orina de las yeguas tienden a incrementar durante los ciclos del estro, llevan información química sobre el estatus sexual de las yeguas, y actúan como un estimulante sexual que incrementa la libido en el semental (Ma & Klemm, 1997). Posteriormente,

Mozûraitis y colaboradores en el 2012, también reportaron cerca de 150 componentes volátiles en muestras de orina de yeguas, pero solo dos sustancias: *m*-cresol y *p*-cresol tienen un aumento significativo en la orina de yeguas en la fase de estro en comparación con yeguas en diestro, y estos dos componentes también estuvieron correlacionados con el tiempo de ovulación, alcanzando su máxima concentración un día antes de la ruptura del folículo ovárico, por lo que con este trabajo, sugieren que particularmente el *p*-cresol podría actuar posiblemente como componente de una feromona sexual.

Hothersall et al. 2010, mediante la técnica de habituación-discriminación, presentaron muestras de heces, orina, y olores corporales (sudor y secreciones lagrimales), a yeguas preñadas y a sus crías, encontrando que los caballos investigan el olor de las muestras en una primera presentación, y que se habitúan en una segunda presentación a todo tipo de muestras; pero solo fueron capaces de discriminar la orina de otras yeguas y caballos castrados. Por lo que aparentemente no son capaces de reconocer a otros individuos por muestras de olores corporales (sudor y secreciones lagrimales). Sin embargo, Perón y colaboradores (2014), también utilizaron la técnica de habituación-discriminación, para determinar si caballos y yeguas son capaces de discriminar entre individuos desconocidos en base a los olores corporales. Utilizaron muestras corporales obtenidas del cuello, pecho, y las secreciones de glándulas lagrimales debajo de los párpados para hacer las presentaciones correspondientes; los resultados obtenidos demostraron que no hay diferencias entre yeguas y caballos, en el tiempo que permanecen explorando un estímulo, pero demostraron que tanto caballos y yeguas se habitúan a los olores, y son capaces de recordar a otros individuos desconocidos por medio de los olores corporales, además de los olores contenidos en la orina y heces.

3.2 Elección femenina de pareja en el caballo doméstico

Las yeguas silvestres que viven en estructuras sociales (harem, bandas o familias) de manera natural, son consideradas poliestricas estacionales, esto quiere decir que muestran una ciclicidad en los periodos de estro y diestro durante la temporada de reproducción. Esta temporada reproductiva inicia en primavera y se asocia con factores externos como el incremento en las horas de luz, la temperatura y la disponibilidad de alimento (Nagy et al. 2000). En el hemisferio norte ocurre de abril a septiembre (Hughes et al. 1975), diversos estudios han reportado también que esta temporada en este hemisferio se extiende de marzo hasta agosto, alcanzando su pico máximo en mayo y junio (Tyler, 1972; Feist & McCullough, 1975; Welsh, 1975; Berger, 1986), también se ha reportado que los nacimientos ocurrieron en entre los meses de noviembre, agosto y a finales de primavera (Berger, 1986).

Las yeguas llegan a ser sexualmente maduras entre el primero y los dos años de edad, y los sementales a los dos y tres años de edad, (Tyler, 1972; Feist & McCullough, 1975; Welsh, 1975, Hoffmann, 1985), la mayoría de los nacimientos ocurren durante la noche o justo antes de oscurecer (Berger, 1986). La esperanza de vida reproductiva en vida silvestre varía de los 2 años hasta los 21 años de edad, y la máxima esperanza de vida es de 18 a 25 años de edad (Turner & Kirkpatrick, 1986; Kaseda et al. 1995).

El ciclo de estro completo de la yegua es de 21-22 días, y ocurre aproximadamente cada tres semanas. Este ciclo comprende dos fases: el estro (celo) normalmente se muestra en primavera y verano con un intervalo de 5 – 6 o 7 días de estro, donde tiene lugar la ovulación entre las 24 - 48 horas antes del término del estro, tiempo óptimo para que ocurra la oportunidad de concepción en las yeguas; y la fase de diestro (fuera de calor) con alrededor de 15 días. Posteriormente el anestro tiene lugar a finales de otoño e invierno, periodo prolongado en el cual, la yegua no presenta ciclicidad estral (estro-diestro) (Hughes et al. 1972; Aurich 2011).

En el diestro, así como en el anestro, la yegua no es receptiva sexualmente y no manifiesta ningún interés por un semental; si el semental se acerca, ella realiza expresiones faciales que reflejan tensión, baja las orejas y las gira hacia atrás. Si la yegua se exhibe inquieta, ella lo evita alejándose, pero si el semental hace contacto físico, ella grita y amenaza al semental, si aun así el semental persiste, ella se dirigirá directo al ataque físico (Asa et al. 1979).

En caso contrario, cuando el periodo de estro ocurre, la yegua suele permanecer apartada de otras yeguas, y fijan su atención en el semental, lo sigue mientras levanta la cola y permanece más tiempo cerca de él (Asa et al. 1979). Por ejemplo, las yeguas silvestres de Alberta se acercan e inician el cortejo con el semental dominante mientras rechazan a todos los sementales subordinados que se acercan (Salter, 1978). Las yeguas más experimentadas rechazan la atención de jóvenes machos inexpertos por medio de mordidas y patadas (Tyler, 1972; Berger, 1986).

Una yegua receptiva permanece dócil y permite que el semental la examine, olfatee, muerda, y la toque con el hocico; ella también puede reaccionar ante estos estímulos, puede emitir chillidos agudos, patear al aire y tocar el hocico del semental; a su vez el semental puede recurrir a la investigación de la región perianal de la yegua, provocando en ella el vaciado de pequeñas cantidades de orina con más frecuencia, reportado con un máximo de 21 veces por hora, mientras esta en presencia de un semental, y se mantiene así durante todo el estro (Asa et al. 1979); se ha reportado que la tasa de la respuesta del flehmen varía durante los ciclos de estro de la yegua, pues la frecuencia de la micción en la yegua incrementa la respuesta del flehmen por parte del semental, pudiendo enviarle información sobre su estado reproductivo (Stahlbaum & Houpt, 1989). Adicionado a esto se presenta otra conducta característica durante el estro conocido como *Squatting*, en la que la yegua expone su región perianal hacia el semental, adopta una postura en la que baja la pelvis, separa sus miembros posteriores, levanta la cola y levanta el clítoris varias veces, acción que se conoce como “espejeo” (*Winking* o *Flashing*)

(McDonnell, 2005; Clayton et al. 1981), que es un signo conductual característico de disposición de la yegua para aparearse (McDonnell, 2003).

El semental solo manifiesta interés por yeguas maduras y receptivas, la yegua es quien atrae la atención e incrementa el interés sexual del semental, principalmente por la atención a la orina (Waring, 2003), posteriormente continúa el acercamiento mutuo y las actividades pre-copulatorias. La cópula ocurre varias veces durante el estro, pero las yeguas son especialmente más receptivas hacia un macho entre 1- 3 días antes de la ovulación, y al término del estro la conducta y receptividad sexual decrecen a mediados del verano, hasta finalizar el celo y cuando llega el invierno, la temporada de reproducción es pausada (Asa et al. 1979). Si en el harem existe más de una yegua en celo al mismo tiempo, ellas repetirán el mismo patrón conductual cerca del semental, teniendo mayor probabilidad de apareamiento las yeguas que persistan más (Ginther et al. 1983).

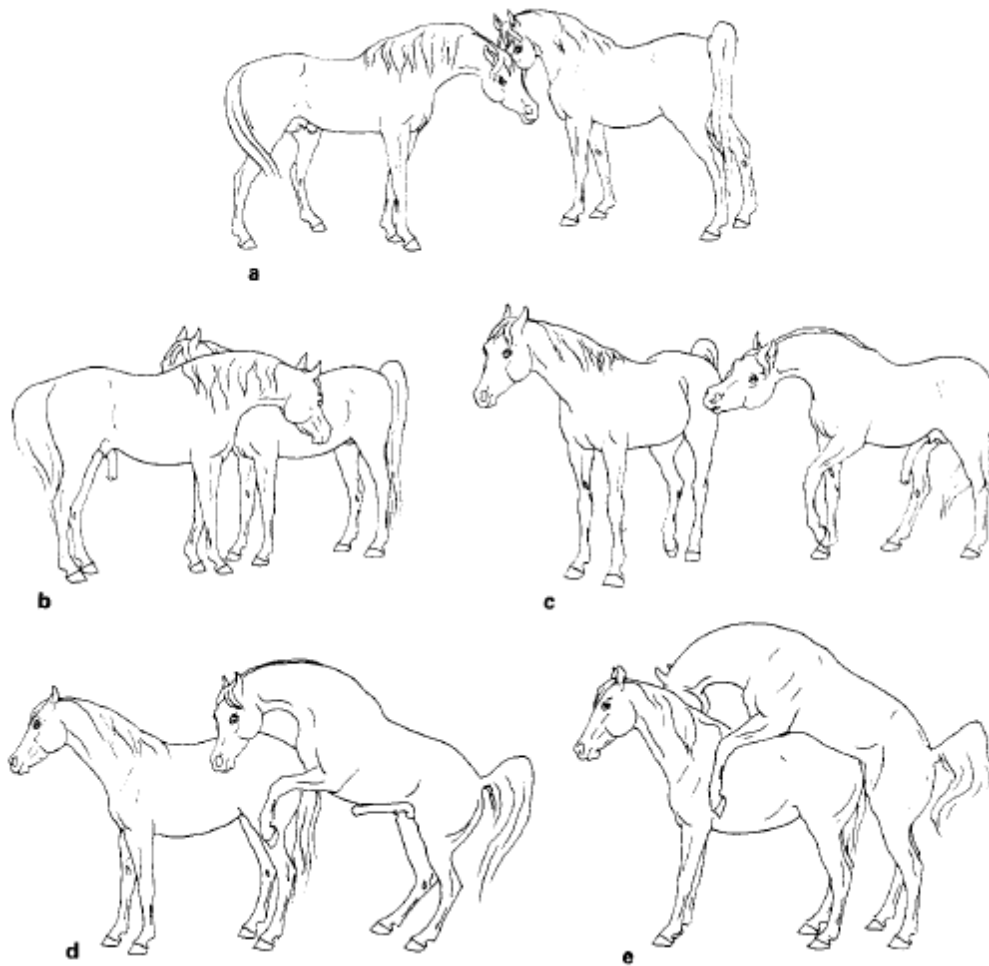


Figura 6. Secuencia de la conducta sexual de un semental con una yegua en estro (Waring 2003).

Las potrancas jóvenes (al año), que exhiben por primera vez el estro al mismo tiempo que lo están otras yeguas maduras, generalmente son menos atractivas para el semental (Asa et al. 1986), por lo que las potrancas suelen abandonar a sus harems de origen para formar nuevos grupos y mantener la estructura social y reproductiva (Tyler, 1972; Feist & McCullough, 1975;1976).

Miller (1981), en sus estudios con caballos del Desierto Rojo, encontró que los sementales que no lograron la intromisión fueron casi siempre por conductas agresivas de la yegua hacia el semental, sugiriendo que ellas ejercen una elección.

Las yeguas que algunas veces habían sido retiradas de su familia intentaron regresar a su grupo de origen a lo largo de dos días, lo cual pudiera indicar la preferencia de las yeguas por el semental original o por otras yeguas desconocidas (Miller, 1979).

Pickerel y colaboradores en 1993, destacaron la importancia de conocer las preferencias sexuales de la yegua en el caballo doméstico, ya que ciertas preferencias juegan un papel importante en la selección de pareja durante el apareamiento, del mismo modo que detectar las preferencias sexuales de la yegua facilita un mejor manejo para la reproducción. En su estudio formaron un grupo de caballos, contenido por 8 hembras adultas y por 6 sementales adultos, que habituaron mediante contacto visual. Registraron conductas focales en la yegua como: levantamiento de la cola, el pestañeo rítmico del clítoris, y el Squatting, al igual que registraron la frecuencia de cada conducta; y registraron eventos como las vocalizaciones emitidas por parte del semental. Con ello encontraron que las yeguas durante el ciclo de estro, si manifestaron preferencias definidas por sementales dentro de sus grupos durante la temporada de apareamiento, y observaron una correlación positiva, entre el tiempo que una yegua permanece cerca de un semental particular y las vocalizaciones emitidas por el mismo durante el cortejo. De igual manera, así como las yeguas manifestaron tener ciertas preferencias, también manifestaron evitar a otros sementales.

De este modo, tal parecer que las hembras pueden elegir como pareja potencial a algún macho en particular, y aunque parece ser que las vocalizaciones del macho son utilizadas por las hembras para realizar su elección, la comunicación química es también importante para esta especie, y aun demostrándose que los caballos poseen diversas fuentes de olores como la orina y heces, cuyos componentes posiblemente pueden tener alguna función biológica en el contexto social y en la elección de pareja; también se han estudiado otras fuentes de olores que podrían ser importantes para la comunicación química en la elección de pareja de esta especie.

En el caballo doméstico se ha reportado que, durante el cortejo se observan contactos de la nariz con el codo o flancos, regiones corporales que contienen gran cantidad de glándulas sudoríparas (Feh, 2005). Estas glándulas sudoríparas están presentes por todas partes y en grandes cantidades por todo el cuerpo del caballo; en la crin, labios y extremidades se presentan en menor número. Pero en el cuello, se halla una gran cantidad de glándulas sudoríparas (Smith, 1888). La piel de este ungulado posee también glándulas sebáceas que se encuentran ampliamente distribuidas, son particularmente abundantes y se encuentran estrechamente juntas en el margen de los labios, por ejemplo, en la piel del cuerpo, muslos, cola y crin se encuentran dos glándulas sebáceas por cada pelo. En la piel de la crin estas glándulas son más grandes que en cualquier otra región corporal, particularmente en su longitud (Smith, 1888). Por lo que la importancia del enorme número de glándulas sebáceas y sudoríparas distribuidas por el cuerpo de este ungulado, derivo a realizar un trabajo publicado en 1890, donde se determinó la composición química del sudor del caballo doméstico. Se reportó que contenía proteínas como albúmina y globulina, así como otros componentes inorgánicos como cloro, magnesio, sodio, potasio, ácidos fosfórico y sulfúrico (Smith, 1890). Más tarde, se reportó que la albúmina es la proteína que se encuentra en mayor cantidad y la globulina solo en cantidades traza, además de hallar la presencia de mucoproteínas (Jirka & Kotas, 1959).

Sin embargo, en estudios más recientes, las lipocalinas son proteínas que también se han detectado que participan en la comunicación química de los vertebrados como acarreadoras de feromonas (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000; Pelosi, 2001); reportadas por primera vez como principal complejo proteico MUPs (Major Urinary Proteins), presentes en la orina del ratón y rata, sintetizadas por el hígado y excretadas en la orina (Finlayson et al. 1965; Shaw et al. 1983); también presentes en las glándulas parótidas, sublinguales, submaxilares, en glándulas lagrimales y glándulas mamarias del ratón (Shahan et al. 1987).

Se trata de una gran familia de proteínas extracelulares con alrededor de 17-30 KDa, que tienen una estructura de cristal comúnmente en forma de barril, que

encierran un sitio de unión para un ligando endógeno, que se une a receptores específicos de la superficie celular, de donde se enlazan a pequeñas moléculas hidrofóbicas como el retinol, de tal manera que funcionan como acarreadoras de olores (posiblemente feromonas) que son secretados al medio ambiente por medio de secreciones corporales acuosas (Flower, 1996).

Por ejemplo, se ha reportado la presencia de una lipocalina, feromaxeina, en la saliva del cerdo, transportadoras de androstenol y androstenona, compuestos de la feromonal sexual en la saliva de cerdo (Booth, 1984; Marchese et al. 1998; Loebel et al. 2000; Scaloni et al. 2001; Spinelli et al. 2002). La “afrodisina”, otra lipocalina presente en los fluidos vaginales del hámster hembra, que transporta la molécula 1-hexadecanol volátil, actuando como atrayentes sexuales de machos ayudando a promover la copula (Singer et al. 1986; Singer et al. 1990; Henzel et al. 1988; Briand et al. 2000); otro ejemplo a mencionar son, las feromonas volátiles presentes en la orina del ratón y rata, ligadas a lipocalinas de 19 KDa (Bacchini et al. 1992; Böcskei et al. 1992; Cavaggioni et al. 1990; Robertson et al. 1993), las cuales se encuentran hasta en niveles de 70 mg/ml en la orina del ratón macho (Beynon & Hurst, 2003) implicadas en el marcaje territorial (Hurst, 1990). Finalmente, el ácido 3-metil-2-heptanoico, el cual es acarreado hacia la superficie de la piel por otra lipocalina llamada apoliproteína, presentes en el sudor axilar dando como resultado el olor característico del sudor humano (Zeng et al. 1996).

Particularmente en el sudor de caballo doméstico, se ha reportado el hallazgo de la lipocalina EquC1, con principal componente del sudor de caballo y como un potente alérgeno (Dandeu et al. 1995; Gregoire et al. 1996; Bulone et al. 1998; Lascombe et al. 2000). D’Innocenzo (2006) y su equipo de trabajo, obtuvieron la caracterización y actividad de la lipocalina EquC1, extraída y purificada del sudor corporal del semental; confirmaron que los sitios ligando endógenos de la EquC1 presentan siempre una gran afinidad por la oleamida, a pesar de haber sido probados con otros componentes, por lo que, la potencia del sitio ligando endógeno probablemente dependen de varios factores como el estado fisiológico del caballo, la causa que produce la sudoración y el sitio de colección en el cuerpo del caballo;

Además demostraron que existe una similitud estructural (forma común B-barril tridimensional de todas las lipocalinas) con las lipocalinas presentes en la saliva de cerdo y en la orina del ratón. A pesar de que no se han realizado estudios que demuestren componentes fenomenales en el sudor del caballo, se sugiere que EquC1 entonces, podría desempeñar un papel similar como acarreadoras de componentes volátiles (oleamida) o presumiblemente feromonas en el sudor del caballo doméstico, que, de ser liberadas paulatinamente al ambiente, participan como fuertes mensajeros químicos en esta especie, para lograr la comunicación entre los miembros de ambos sexos (D'Innocenzo et al. 2006).

La conducta sexual de la yegua en el caballo doméstico manifiesta patrones similares que en sus congéneres silvestres. Sin embargo, la elección de pareja y el apareamiento tienden a funcionar bajo ciertas restricciones. El manejo y cuidado de las yeguas en el establo radica en la procreación y la obtención de crías con ciertas características de interés económico para el humano, aunque generalmente se contraponga con el bienestar de los caballos, particularmente de las yeguas. Por ejemplo, un buen manejo en la reproducción de la yegua es llevado a cabo para la obtención de crías y la selección de algunas razas, por lo que el apareamiento de la yegua suele realizarse mediante montas dirigidas por los criadores, o mediante inseminación artificial. Una de las técnicas más comúnmente utilizada es la técnica de palpación o el ultrasonido realizado para determinar el tamaño del folículo ovárico en desarrollo y poder calcular las horas probables de ovulación, para practicar la monta dirigida por el criador.

Se han utilizado también diversos tratamientos hormonales para inducir o sincronizar la ovulación y así facilitar el manejo reproductivo, reducir la manipulación de los animales e incrementar el éxito de la aplicación de biotécnicas reproductivas (McCue 2003). La progesterona por varias rutas de administración, ya sea sola o seguida de prostaglandina F2 alfa o sus análogos, son útiles para la sincronización del estro (Handler et al. 2006). El tratamiento con progesterona, también acelera el inicio de la estación reproductiva, facilita el manejo reproductivo durante todas las estaciones del año (Arbeiter et al. 1994; Gastal et al. 1999; Cuervo-Arango & Clark

2010; Hanlon & Firth 2012). Los agentes hormonales comúnmente utilizados en las yeguas para inducir la ovulación son: gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona luteinizante recombinante, factor liberador de gonadotropinas (GnRH, Cystorelin®), deslorelina inyectable, deslorelina en implante (Ovuplant®) (Samper 2008).

El Ovuplant contiene un análogo de GnRH llamado deslorelina (McKinnon et al. 1993), es un dispositivo hormonal que se coloca debajo de la piel después que el folículo alcanza los 30-35 mm de diámetro, la ovulación ocurrirá entre las 38 y 42 horas después del tratamiento (McKinnon et al. 1996; Samper et al. 2002).

Por otra parte, para evitar el uso de sustancias hormonales, se encuentra la manipulación por fotoperiodo, recordando que las yeguas son animales estacionalmente poliestrales, se puede inducir el estro en el invierno, ajustando 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Watson, 1998).

Otra técnica utilizada en la reproducción de los caballos es la inseminación artificial con semen refrigerado (Samper, 2001), actualmente, el envío de semen únicamente de sementales registrados, ha sido uno de los recursos más utilizados que evita el traslado de la yegua a otros recintos lejanos. La inseminación artificial con semen fresco es también una práctica común (Parkinson & Morrell, 2019).

Pese a las prácticas comúnmente realizadas para la reproducción exitosa en el caballo doméstico, Bartos y sus colaboradores (2011), en una encuesta realizada en República Checa, pudo observar que posiblemente, las yeguas son capaces de interrumpir su embarazo cuando son expuestas al olor o a la presencia de un semental diferente con el que fue apareada.

Este fenómeno en la yegua se atribuye a causa de haberse logrado la concepción mediante la inseminación artificial o por medio de montas dirigidas por los criadores, donde normalmente consiste en retirar a la yegua de su lugar y grupo de origen, para ser enviadas a otros recintos y lograr el apareamiento con un semental ajeno a su grupo, posteriormente son trasladadas de regreso a su lugar

de origen una vez que se ha logrado la concepción. De 81 registros obtenidos, se reportaron el 54% de casos (13 casos) sobre abortos después del apareamiento, y al regreso de la yegua a su lugar de origen, se mantuvo aislada posteriormente sin la presencia de ningún macho. En el 22% de los casos (32 casos), el aborto se presentó cuando después del apareamiento, la yegua estuvo en contacto (físico o visual) con sementales de su grupo. Ellos justifican que la probabilidad de aborto depende si, en su grupo de origen la yegua mantiene una relación estrecha con un semental en particular, teniendo la falta de oportunidades para confundir la paternidad. También Berger (1983), reportó que los sementales silvestres que tiene el control de una banda, y forzaron a las yeguas a copular, e incluso si quedaban preñadas, se evidencio el resultado de abortos por la mayoría de las yeguas, y algunas yeguas que no habían sido forzadas a copular, también abortaron después de ser sometidas. Kirkpatrick & Turner (1991) usaron el análisis de esteroides de orina y heces para monitorear a ocho yeguas preñadas sometidas por nuevos sementales en la isla de Assateague; tuvieron como resultado que la tasa de agresiones del semental hacia las yeguas fue bajo, y siete de las ocho yeguas dieron a luz, la octava yegua experimento la pérdida fetal, aunque no se observó signos de acoso.

Estudios observados en el caballo salvaje, han revelado que los caballos pueden tener compañeros con los que prefieren pastar o relacionarse (Arnold & Grassia, 1982; Ellard & Crowell-Davis, 1989). También existe una relación entre un semental y una yegua, que se inicia desde la infancia, desarrollando un fuerte lazo de amistad; pero el lazo se hace especialmente más fuerte entre un semental y una yegua, durante varios ciclos de estro, donde la preferencia por el apareamiento es mutua (Tyler, 1972; Waring, 2003). Así la yegua exhibe un acercamiento mutuo con un semental específico, facilitando el cortejo, apareamiento y el contacto social solo con el semental, aun si permanecen lejos, la yegua puede responder ante las vocalizaciones emitidas por el semental de su preferencia (Pickerel et al. 1993).

Con base en los estudios sobre la conducta reproductiva influenciada por los efectos que ejercen las pistas químicas, en especial estudios realizados en los

mamíferos, el objetivo de este trabajo es conocer las preferencias sexuales de las yeguas por machos particulares y sus olores, considerando los reportes sobre los componentes químicos en el sudor del caballo, como la lipocalina EquC1, molécula que por su naturaleza química es presumiblemente responsable de actuar como un acarreador de feromonas, que podrían actuar como un atrayente sexual, por lo anterior proponemos la siguiente hipótesis.

4. Hipótesis

Las hembras del caballo doméstico (*Equus caballus*) prefieren el olor del sudor de “su macho preferido”, en comparación con el de “su macho no preferido”.

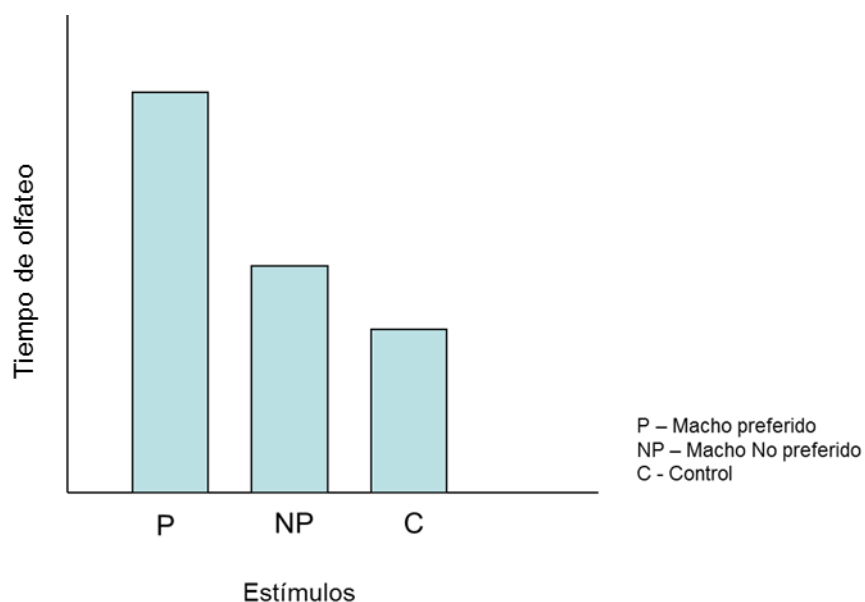


Figura 7. Representación gráfica de la Hipótesis.

5. Objetivo General

Determinar si las yeguas prefieren el olor de “su macho preferido” en comparación con el de “su macho no preferido”.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar las preferencias particulares de las yeguas por machos particulares.
- Obtener el sudor de los machos “preferido” y “no preferido” para cada yegua.
- Determinar si las yeguas prefieren el olor del sudor de “su macho preferido” en comparación con el de “su macho no preferido”.

6. Metodología

6.1 Animales

Se utilizaron 12 yeguas adultas intactas de razas diversas (nueve criollas, dos $\frac{1}{4}$ de Milla y una Azteca F), con edades entre 7 y 23 años, 10 de las 12 yeguas tenían experiencia reproductiva previa, alimentadas con alimento concentrado *Ímpetu Línea Montana Clásico* y heno de alfalfa, en condiciones de salud adecuadas. Las yeguas estuvieron en celo al momento de realizar las pruebas conductuales, ello con el fin de que mostraran preferencia por los machos (Pickerel et al. 1993).

Como donadores de olor (sudor) se utilizaron seis garañones adultos intactos de razas diversas (dos Azteca, un Español, un Lucitano, un $\frac{1}{4}$ de Milla, un Español+Lucitano), con edades entre 6 y 20 años, sexualmente expertos, en condiciones de salud adecuadas, alimentados con alimento concentrado *Ímpetu Línea Montana Clásico* y heno de alfalfa, sin parentesco alguno con las hembras de prueba. De éstos machos se eligieron dos donadores de sudor, el macho “*Preferido*” y el “*No preferido*” según las preferencias particulares de cada yegua. Estos machos

podían ser los mismos para varias de las yeguas. Se ha reportado que un macho preferido por una hembra, puede ser el no preferido por otra (Pickerel et al. 1993). En las pruebas conductuales de preferencia de sudor de los machos, se utilizaron ocho de las 12 yeguas, pues concluyó el tiempo de estancia permitido para realizar las pruebas con los animales en el sitio de estudio; de las ocho yeguas, una no se incluyó en el análisis estadístico debido a que no realizó ninguna conducta frente a los estímulos.

6.2 Sitio de estudio

El estudio se realizó en las Instalaciones de la Unidad de Medicina Veterinaria de la Policía Metropolitana Montada, de la Secretaría de Seguridad Pública, ubicada en la Delegación Iztapalapa, Ciudad de México, entre noviembre 2015 y enero 2016.

6.3 Procedimiento experimental I: Determinación de los machos “Preferido” y “No preferido” de cada yegua

La preferencia de las hembras por machos particulares se determinó previo a las pruebas conductuales de discriminación de olor (sudor), siguiendo el procedimiento de Pickerel y sus colaboradores (1993). Las preferencias de las hembras se determinaron durante el estro. Las yeguas se habituaron al corral de pruebas durante 30 minutos, en cualquier día del ciclo estral.

Utilizando un macho diferente a los sujetos donadores de sudor, se detectaron signos conductuales de estro de las yeguas (*Squatting*), que se caracterizan por un incrementado interés en el garañón y despliegue de conductas proceptivas en respuesta al macho (Crowell-Davis, 2007), tales como dirigir sus cuartos traseros hacia el semental y mostrar una postura característica con la pelvis baja y las extremidades posteriores flexionadas (en cuclillas), la cola desviada a un lado para exponer la región perineal y “*winking*” (eversión rítmica del clítoris junto

con movimientos de apertura y cierre de los labios de la vulva), así como evacuación frecuente de pequeñas cantidades de orina (Aurich, 2011).

Los seis donadores se asignaron a dos grupos de tres machos cada uno. Las yeguas se asignaron también a dos grupos ($n=6$ c/u). Un grupo de machos se utilizó con un grupo de yeguas. Se formaron tres diadas (3 combinaciones) de machos por grupo, que se les presentó a cada una de las yeguas del grupo correspondiente (una diada por día).

Los dos machos de una diada, se colocaron en barandales de contención contiguos que limitaban un corral, se llevó a la yegua a dicho corral, se colocó en el centro con la cabeza en dirección a los machos y se dejó que deambulara libremente en el área de prueba por 10 min. Las pruebas se grabaron con videocámara para su posterior análisis. Se utilizó el programa Solomon Coder.Ink para el análisis de los videos conductuales. Se registró el tiempo total que la yegua pasó dentro del área de un macho (2.5 m de distancia a partir del barandal donde se encontraba el macho). Se consideró al macho "*Preferido*" aquel con el que la yegua pasó más tiempo total. El "*No preferido*" aquel con el que la yegua pasó menos tiempo total.

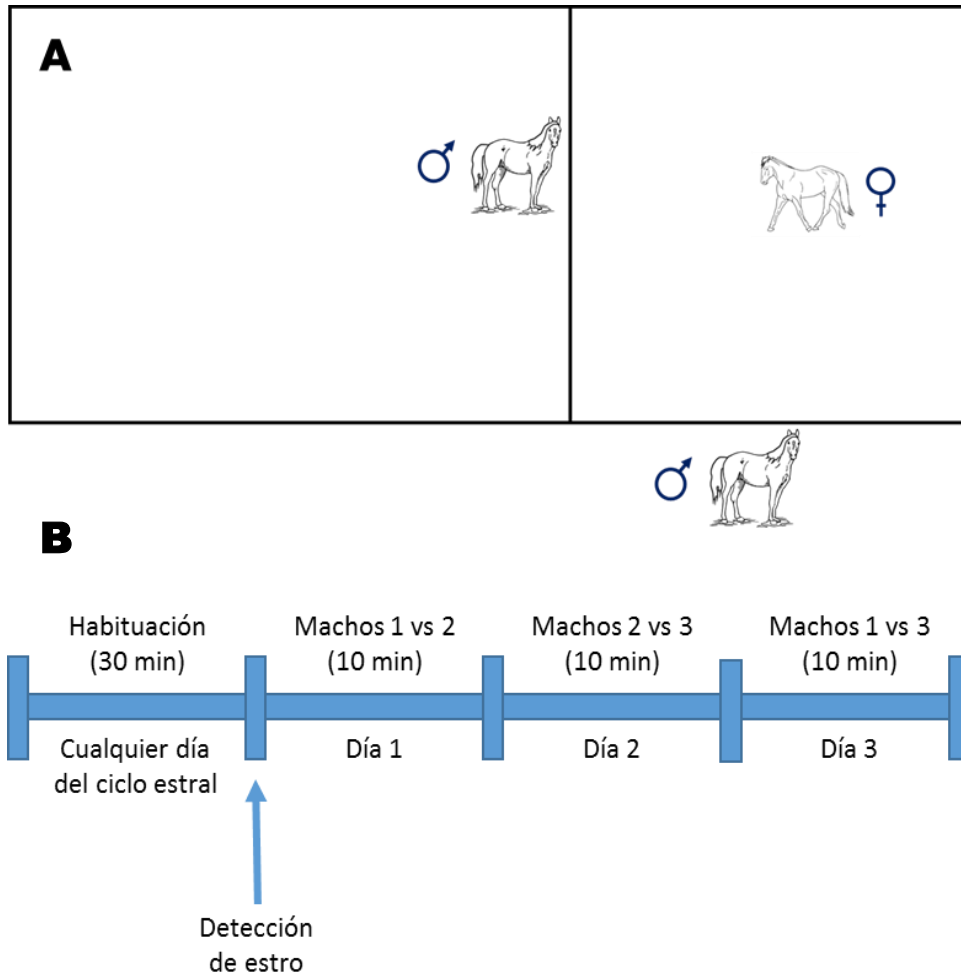


Figura 8. A) Representación esquemática del área de pruebas para determinar las preferencias de las hembras (modificado de Pickerel et al. 1993). B) Procedimiento experimental I.

Se registraron las siguientes variables conductuales de las yeguas.

Visita: yegua ubicada dentro del área de un macho (2.5 m de distancia a partir del barandal donde se encontraba el macho). Se obtuvo la latencia, frecuencia y duración de cada visita.

Squatting: la yegua dirige sus cuartos traseros hacia el semental y muestra una postura característica con la pelvis baja y las extremidades posteriores flexionadas (en cuclillas), la cola desviada a un lado para exponer la región perineal y “*winking*” (eversión rítmica del clítoris junto con movimientos de apertura y cierre de los labios de la vulva), así como evacuación frecuente de pequeñas cantidades de orina. Se obtuvo la duración total de cada evento de *Squatting*.

En los machos, se registró la frecuencia de *vocalizaciones* de éstos durante las visitas de las yeguas.

6.3.1 Análisis estadístico de los datos I

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk a los datos. Todas las comparaciones se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. La comparación de la duración total en segundos de las visitas que realizaron las yeguas a los sementales Preferidos y No preferidos, se realizó con una prueba de t pareada. Se utilizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para comparar la latencia y frecuencia de dichas visitas. Se utilizó una prueba t pareada para comparar la duración de la conducta de *Squatting* de las yeguas con los sementales Preferidos y No preferidos.

Se realizó una ANOVA de una vía para determinar las diferencias en la frecuencia de vocalizaciones de los sementales, para determinar qué semental fue el que realizó mayor número de vocalizaciones, se aplicó una prueba post hoc de Tukey.

6.4 Procedimiento experimental II: Discriminación del sudor de los machos “Preferido” y “No preferido” por parte de las yeguas

Obtención del sudor de los sementales donadores. El “macho preferido” y “macho no preferido” de cada yegua se hicieron correr hasta que comenzaron a sudar (Figura 9). Utilizando guantes de látex, con una toalla limpia se colectó el sudor corporal del caballo en cuello, flancos y codos de las extremidades, áreas con abundantes glándulas sudoríparas en la piel (Smith, 1888); posteriormente la toalla con la muestra odorífera se colocó sobre un poste de plástico, de aproximadamente cuarenta cm de largo, se sujetó con un cordón y se introdujo en una bolsa de plástico, ello para permitir la posible actividad de las bacterias sobre el sudor y permitir la liberación de olores.



Figura 9. Obtención de sudor de los machos.

Prueba conductual de preferencia de estímulos. Consistió en presentar a la yegua en estro tres postes con muestras odoríferas diferentes: uno con el sudor de su “macho preferido”, un segundo con el sudor de su “macho no preferido”, y el tercero con agua destilada como control (Figura 10). Los estímulos se presentaron dos veces por día, la primera presentación se realizó durante cinco minutos, seguida de

un tiempo intermedio de 10 minutos antes de la segunda presentación, también de cinco minutos. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento con el objetivo de conocer la consistencia de la respuesta de la yegua frente a los estímulos. Dos o tres personas sujetaron los postes con los estímulos (una persona podía sujetar ya sea uno o dos postes), a una distancia de 40 cm y a la altura del hocico de la yegua. Ésta se colocó y mantuvo cerca de los estímulos. Cabe resaltar que los estímulos se mostraron en diferente orden en cada presentación y la forma de presentar los estímulos se tomó de Péron y sus colaboradores (2014) con las adecuaciones pertinentes.

Se registró la duración de olfateos a cada poste con el estímulo. Se consideró que la yegua visitaba un estímulo cuando ésta se encontraba a una distancia de diez cm, con la cabeza inclinada hacia el poste (Perón et al. 2014), un *olfateo al estímulo* cuando la nariz de la hembra estuvo dirigida hacia el estímulo y realizo inhalaciones repetidas (Christensen & Rundgren, 2008). Las pruebas se grabaron con una cámara de video para su posterior análisis. Se utilizó el programa Solomon Coder.Ink para el análisis de los videos conductuales.

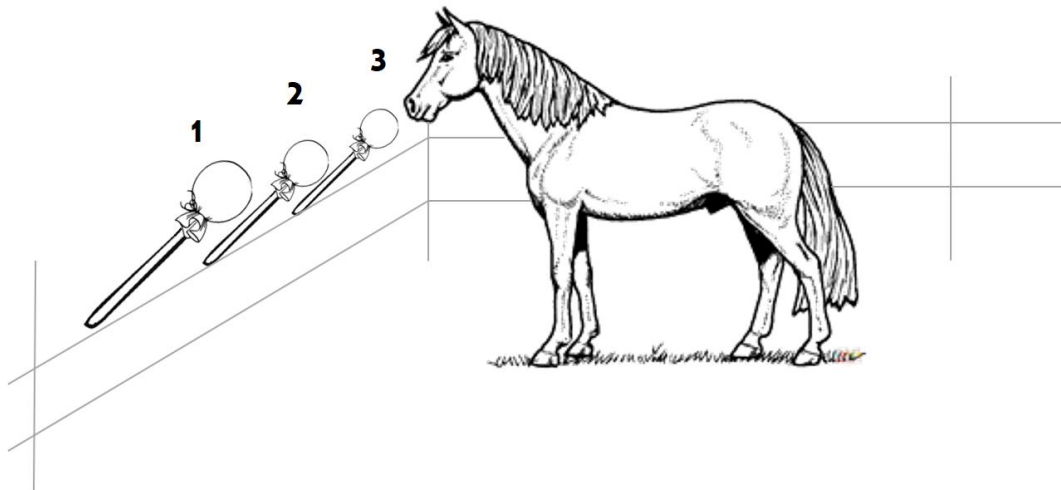


Figura 10. Representación esquemática de la prueba conductual de preferencia de estímulos (Modificado de Perón et al. 2014).

6.4.1 Análisis estadístico de los datos II

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk a los datos. Todas las comparaciones se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. La duración de olfateo de las yeguas a los estímulos, sudor del Macho Preferido, No preferido y Control se analizó con la prueba Kruskal-Wallis.

En las Pruebas 1 y 4 (ver resultados), como variable dependiente se calculó el porcentaje de tiempo que las hembras realizaron la conducta de olfateo. Lo anterior para establecer una relación de la variable dependiente con los tipos de estímulo a los que se expuso a las hembras. Se utilizó el programa R, version 3.4.1 (R Core Team, 2017)

Se realizó un modelo lineal mixto (Bates et al. 2015) y comparaciones post hoc (Tukey). Se probó el ajuste de normalidad y homogeneidad de varianzas por medio de graficos e histogramas con los residuales del ajuste al modelo. Se consideró como factor fijo al tipo de estímulo (Macho Preferido, No preferido y Control) y como factor aleatorio la identidad de la hembra.

7. Resultados

Se analizaron 36 videos conductuales para determinar las preferencias particulares de las hembras, así como 32 para determinar las preferencias de sudor de los machos “Preferido” y “No preferido”.

7.1 Descripción del comportamiento de las yeguas en presencia de los machos

Todas las yeguas mostraron todas las conductas descritas. Dado que se observó la interacción entre la yegua y el semental, se describe también el comportamiento de los machos.

La yegua se dejó deambular libremente por el corral, se acercó a uno de los sementales por un tiempo y después visitaba al otro, algunas yeguas realizaron varios cambios en sus visitas a un macho y otro. Durante la visita de la yegua al semental, éste emitía numerosas vocalizaciones. Una vez que la yegua se acercaba a un macho, había contacto visual seguido de contacto físico con la nariz, el macho daba mordiscos a la yegua en el cuello, pecho, espalda, nuca y crin. También, el semental olfateaba los corvejones de las patas traseras y los costados de la yegua.



Figura 11. Arriba: visita de la yegua (color café) al semental (color negro) en la arena de pruebas. Abajo: yegua (color café) permitiendo el contacto físico con la nariz del semental (color blanco).



Figura 12. Izquierda: contacto físico con la cabeza entre el semental (con cuerda en la cabeza) y la yegua. Derecha: interacción entre el semental (color negro) y la yegua (color blanco).

La yegua en estro permaneció de pie quieta frente al macho, respondió ante el contacto físico golpeando el piso con las pezuñas delanteras, o bien, emitiendo una vocalización aguda (*Squeal*). La yegua realizó la conducta de *Squatting* en dirección al macho. El semental exploraba la región perianal de la yegua, después de varias inhalaciones, el semental podía desplegar la conducta de flehmen, o no. Algunas ocasiones el semental intentaba realizar la monta a la yegua, acción que no se permitió. La yegua podía concluir su visita con ese macho y dirigirse con el otro, repitiéndose nuevamente el patrón conductual. El semental que no recibía una visita de la yegua, comenzaba a vocalizar y golpear el piso con las pezuñas delanteras.

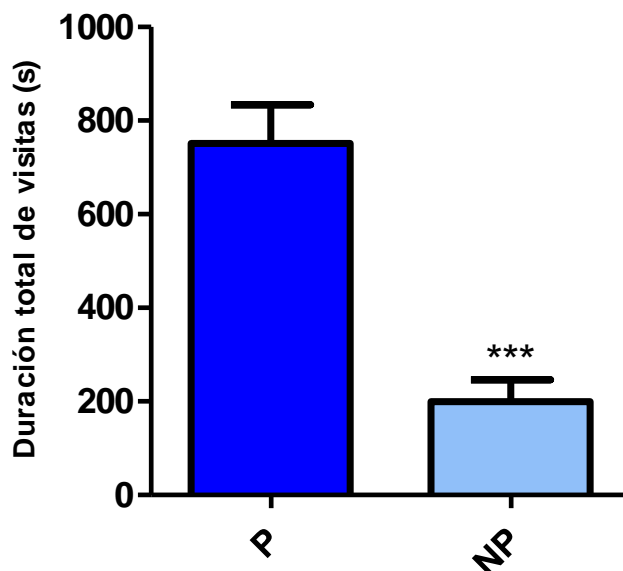


Figura 13. Arriba: exploración y olfateo de la región perianal de la yegua (color café) por parte del semental (color blanco). En medio: despliegue de Flehmen por el semental (color negro). Abajo: yegua (color café) realizando *Squatting* e intento de monta por parte del semental (color negro).

7.2 Determinación de las preferencias de las yeguas

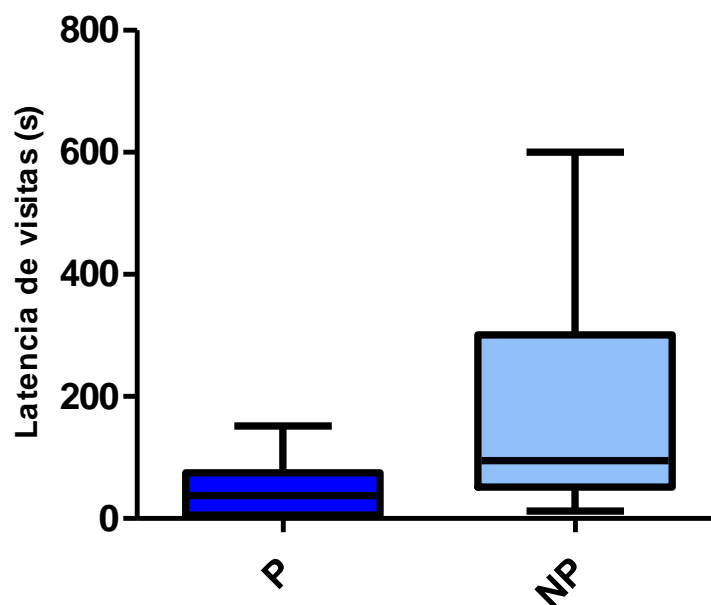
Las yeguas mostraron preferencias particulares por los machos (Tabla 1), considerando al “preferido” aquel con el que la yegua pasó más tiempo total, el “no preferido” fue aquel con el que la yegua pasó menos tiempo total.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la duración total de visitas que recibieron los sementales “preferidos” en comparación con los “no preferidos” por las yeguas (*t* pareada, *prom* ± e.e. *n*=12, *p*=0.0003), ver Gráfica 1.



Gráfica 1. Duración total de visitas que recibieron los sementales “preferidos” (P) en comparación con los “no preferidos” (NP) por las yeguas.

Aunque se esperaba que la latencia de visitas a los sementales por parte de las yeguas fuera menor para los machos “preferidos” en comparación con los “no preferidos”, no se encontraron diferencias significativas (*W*=-48, rangos 15.00, -63.00, *n*=12, *p*=0.06), ver Gráfica 2.



Gráfica 2. Latencia de visitas que recibieron los sementales “preferidos” (P) en comparación con los “no preferidos” (NP) por las yeguas.

No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de visitas a los machos “preferidos” en comparación con los “no preferidos” ($W=38$, rangos 52.00, -14.00, $n=12$, $p=0.09$ ns). Los machos “preferidos” no recibieron una mayor frecuencia de visitas, aunque el tiempo total de estas visitas fue mayor.

Tabla 1. Preferencias particulares de cada yegua por los machos. Se consideró al “macho preferido” aquel con el que la yegua pasó más tiempo total en segundos. El “no preferido” aquel con el que la yegua pasó menos tiempo total. ID: clave de identificación de cada animal.

ID Yegua	ID Preferido	Duración total (s)	ID No Preferido	Duración total (s)
A66	945	1034	J43	86
904	945	892	J43	259
I51	J43	128	945	18
A59	J43	1180	I24	0
886	945	698	I24	223
B22	J43	795	945	334
A62	C4	622	H35	464
931	H35	836	F17	104
A79	C4	604	H35	459
B29	C4	466	H35	213
I23	C4	694	H35	231
917	C4	1066	F17	0

Con base en el número de yeguas para las que fue preferido ($n=6$ por grupo) y la duración total de visitas por las yeguas para las que fue preferido, C4 fue el más preferido, seguido por 945; I24 y F17 fueron los menos preferidos (Tabla 2).

Tabla 2. Qué macho fue el más “preferido” y qué macho el “no preferido” por las yeguas de cada grupo.

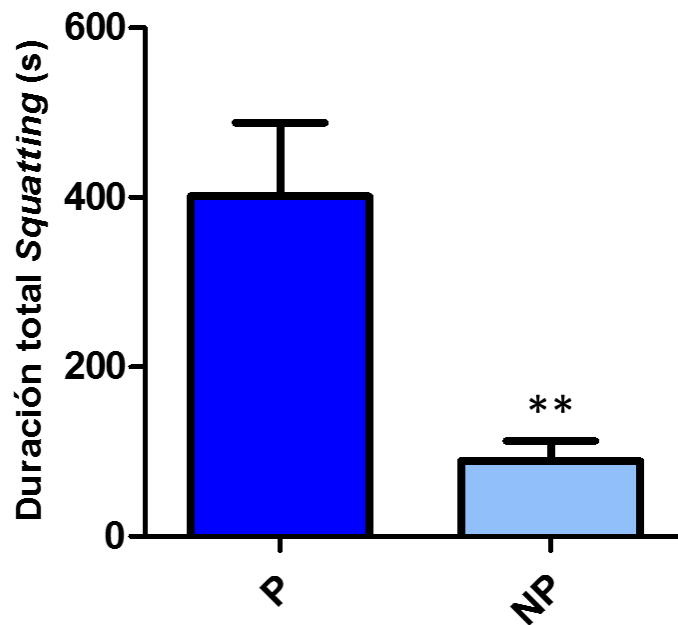
ID Macho	Preferido	No preferido		Duración total (s)
C4	preferido por 5 de 6 yeguas	no preferido por 0 de 6 yeguas	duración total de visitas por las 3 yeguas para las que fue preferido	3452
945	preferido por 3 de 6 yeguas	no preferido por 2 de 6 yeguas	duración total de visitas por las 3 yeguas para las que fue preferido	2624
J43	preferido por 3 de 6 yeguas	no preferido por 2 de 6 yeguas	duración total de visitas por las 3 yeguas para las que fue preferido	2103
H35	preferido por 1 de 6 yeguas	no preferido por 4 de 6 yeguas	duración total de visitas por la yegua para la que fue preferido	836
I24	preferido por 0 de 6 yeguas	no preferido por 2 de 6 yeguas	no fue preferido por ninguna yegua	0
F17	preferido por 0 de 6 yeguas	no preferido por 2 de 6 yeguas	no fue preferido por ninguna yegua	0

Según las preferencias particulares de las yeguas, éstas realizaron la conducta de *Squatting* por más tiempo con su macho “preferido” en comparación con su macho “no preferido” (Tabla 3).

Tabla 3. Duración total (s) de la conducta de *Squatting* que realizó cada yegua según sus preferencias particulares por los machos. ID: clave de identificación de cada animal.

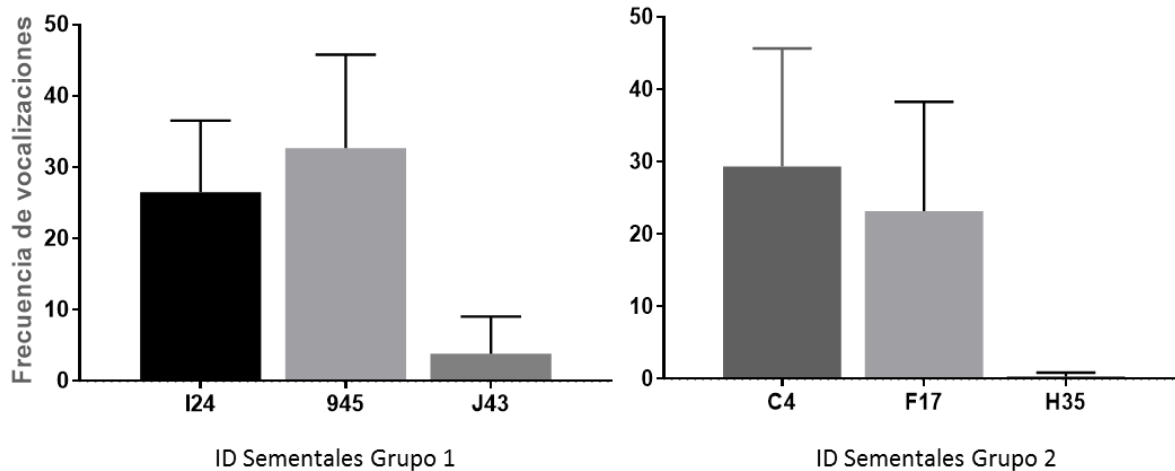
ID Yegua	ID Preferido	Duración total (s)	ID No Preferido	Duración total (s)
A66	945	344.4	J43	45.2
904	945	266.8	J43	52.4
I51	J43	9.2	945	0
A59	J43	1168	I24	0
886	945	529.4	I24	137.6
B22	J43	506	945	165
A62	C4	232.4	H35	167.6
931	H35	562.8	F17	74.8
A79	C4	436.2	H35	267.2
B29	C4	90.6	H35	85.2
I23	C4	175.4	H35	74.4
917	C4	492.4	F17	0

Las yeguas realizaron la conducta de *Squatting* con una duración total mayor con los machos “preferidos” en comparación con los “no preferidos” (*t pareada, prom ±e.e. n=12, p=0.006*), ver Gráfica 3.



Gráfica 3. Duración total de la conducta de *Squatting* que realizaron las yeguas con los sementales “preferidos” (P) en comparación con los “no preferidos” (NP).

Frecuencia de vocalizaciones de los sementales. En el Grupo 1 de machos, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de vocalizaciones (ANOVA $F=13.82$, $p=0.0004$), siendo el semental 945 quien realizó más vocalizaciones, seguido por el semental I24, el macho J43 realizó menos vocalizaciones. En el Grupo 2 (ANOVA $F=8.52$, $p=0.0034$) el semental C4 realizó más vocalizaciones, seguido del semental F17, y siendo el semental H35 quien realizó el menor número de vocalizaciones (Gráfica 4).



Gráfica 4. Frecuencia de vocalizaciones que cada semental realizó en presencia de las hembras; ID (clave de identificación individual de los sementales).

Los machos más preferidos por las yeguas obtuvieron las frecuencias más altas de vocalizaciones.

7.3 Comportamiento de las hembras en respuesta al sudor de los machos

Las yeguas colocadas frente a los postes con los estímulos, podían olfatearlos (inhalar varias veces y inflar las fosas nasales), hacer contacto oral o golpear con la nariz alguno de los postes. Algunas yeguas intentaron morder la muestra. Ninguna yegua desplegó flehmen o realizó vocalizaciones.

Las yeguas investigaban un poste por algunos segundos y dirigían la cabeza a alguno de los postes contiguos. Mostraron mayor interés en los postes durante los primeros minutos de la prueba, su interés disminuyó al final de ésta. Algunas yeguas caminaron hacia otro lado alejándose de los estímulos.



Figura 14. Arriba: yegua colocada frente a los estímulos, de derecha a izquierda postes 1, 2 y 3. Abajo: yegua investigando el poste 2 en la prueba de discriminación de sudor.

7.4 Preferencia de sudor de machos “Preferido” y “No preferido”

Como se mencionó en la metodología, los estímulos (sudor del macho “Preferido”, del “No preferido” y agua destilada como Control) se presentaron en dos días consecutivos, dos pruebas (presentaciones de estímulos) por día.

El tiempo promedio que cada yegua olfateó el sudor de su macho preferido, el de su no preferido y el estímulo control durante las cuatro presentaciones, se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Promedio de tiempo (s) en cada una de las cuatro presentaciones que las yeguas olfatearon los estímulos, sudor del macho “preferido” (P), “no preferido” (NP) y control (C). En las Pruebas 1 y 4 las yeguas olfataron más tiempo el sudor del macho P en comparación con el del NP y el estímulo C.

Presentación de estímulos	P	NP	C
Prueba 1	25.29	11.69	7.66
Prueba 2	13.80	17.63	8.51
Prueba 3	13.51	24.03	9.91
Prueba 4	14.03	7.54	7.17

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo que las yeguas pasaron olfateando los estímulos, sudor de los machos “preferidos”. “no preferidos” y control ($p=0.17$, $Kruskal-Wallis=3.481$).

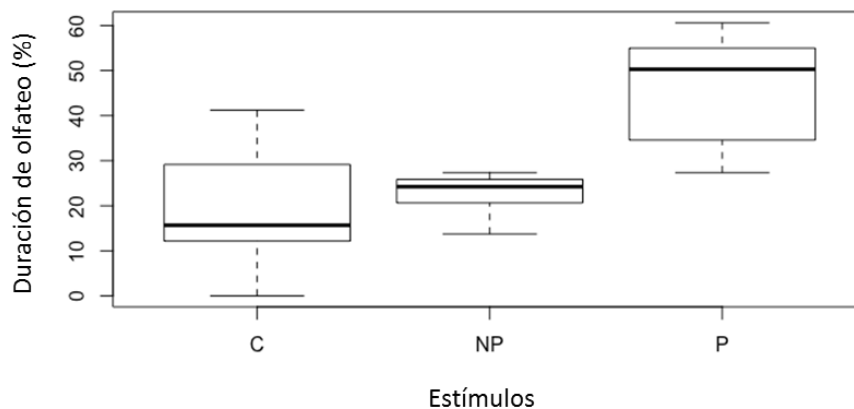
En seguida se describen los resultados por cada una de las pruebas (presentaciones de estímulos).

Día 1. El análisis de la *primera presentación* (Prueba 1) no mostró diferencias significativas ($p=0.3$, $Kruskal-Wallis=2.211$) en el tiempo que permanecieron las yeguas investigando la muestra Control, Preferido y No preferido, pero se pudo observar que permanecieron en promedio más tiempo olfateando la muestra que contenía el olor de su macho preferido (25.29 seg), en comparación con la muestra de su macho no preferido (11.69 seg), y por último olfateando por menos tiempo la

muestra control (7.66 seg). Durante la *segunda presentación* (Prueba 2) no hubo diferencias significativas ($p=0.90$, $Kruskal-Wallis=0.2063$).

Día 2. Durante la *primera presentación* (Prueba 3) se encontraron diferencias significativas ($p=0.2$, $Kruskal-Wallis=2.948$), aunque éstas no se encontraron como se esperaba, entre el preferido y no preferido, o entre el preferido y control, sino entre el no preferido y control. *Segunda presentación* (Prueba 4), no se encontraron diferencias significativas ($p=0.09$, $Kruskal-Wallis=4.717$), sin embargo, la muestra que en promedio más tiempo estuvieron olfateando las yeguas fue la de su macho preferido con 14.03 segundos, olfatearon durante 7.54 segundos la muestra con el olor de su macho no preferido y 7.17 segundos la muestra control.

Dado que en las Pruebas 1 y 4, aunque no hubo diferencias significativas, el tiempo promedio que las yeguas olfatearon los estímulos (Tabla 4) coincidió con la hipótesis, se calculó el porcentaje de tiempo que las hembras realizaron la conducta de olfateo como variable dependiente para establecer una relación de dicha variable con los tipos de estímulos a los que se expuso a las yeguas. Se realizó un modelo lineal mixto y comparaciones post hoc (Tukey), aunque sólo la Prueba 4 mostró diferencias significativas, $X^2=20.159$, $gl=2$, $p<0.001$ (Gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de tiempo que pasan las hembras olfateando los estímulos, C (Control), NP (No preferido) y P (Preferido).

8. Discusión

El comportamiento sexual tanto de las yeguas como de los sementales, ocurrió como se reporta en la literatura (Asa et al. 1979; Clayton et al. 1981; McDonnell, 2003; 2005), lo que indica que las yeguas estuvieron en celo y dispuestas a aparearse. Las yeguas en estro mostraron preferencia por un macho en particular, pasaron más tiempo con éste y desplegaron conducta de estro, como se ha reportado en la literatura (Pickerel et al. 1993).

Los resultados sobre las preferencias de las hembras por machos particulares, corresponde con lo que se ha reportado en la literatura. Pickerel y sus colaboradores (1993) reportaron que las yeguas en estro pasan más tiempo con machos particulares. Los machos más preferidos por las yeguas obtuvieron las frecuencias más altas de vocalizaciones, resultado que coincide también con este estudio, que reporta que las vocalizaciones del macho son utilizadas por las hembras para realizar su elección. Posteriormente, Lemasson y su grupo de trabajo (2015), determinaron que tal preferencia depende de las características acústicas de dichas vocalizaciones. Además de las características acústicas, Burger y colaboradores (2018), exploraron las preferencias de las yeguas con base en características visuales y olfativas de los machos, concluyeron que la etapa del ciclo estral de las yeguas influye significativamente en tales preferencias.

Se han explorado algunas fuentes de olores en los caballos, como la orina, las heces y el olor corporal. Los caballos pueden discriminar entre conoespecíficos por el olor corporal, de sus heces y su orina (Hothersall et al. 2010; Krueger & Flauger, 2011; Péron et al. 2014). Además, en los caballos se ha identificado un perfil de olor individual, cada individuo posee un olor único característico, como una “*huella digital*” (Deshpande et al. 2018).

Otra posible fuente de olores en los caballos es el sudor, producido abundantemente en los caballos (D’Innocenzo et al. 2006). Este estudio exploró si el sudor de los machos podría ser utilizado por las hembras en la elección de pareja, nuestros resultados sugieren la necesidad de explorar mejor la participación de los olores del sudor en la elección femenina de pareja en esta especie. Además, con el fin de hacer más robusto el estudio, sería conveniente aumentar la n de yeguas.

Sin embargo, los resultados de al menos una prueba, nos permite responder afirmativamente a nuestra pregunta de si las yeguas prefieren el olor de “su macho preferido” en comparación con el de “su macho no preferido”. En la última de cuatro pruebas de preferencia de olores, las yeguas olfatearon más el olor de su macho Preferido en comparación con el agua destilada y el macho No Preferido.

A partir de este trabajo podemos sugerir a los reproductores de caballos que, con una prueba de 10 minutos en pocos días, tres específicamente, puede determinarse con qué macho la yegua está dispuesta a aparearse, y así, mejorar la tasa de nacimientos de potrillos, así como el bienestar de las yeguas, al evitar siempre que sea posible, apareamientos forzados.

9. Conclusión

Las yeguas realizan elección femenina de pareja, pues mostraron preferencias por machos particulares, pasando más tiempo con el Preferido en comparación con el No Preferido. Además, al menos en la última prueba de identificación de olores, mostraron preferencia por el olor de su macho Preferido.

10. Referencias

Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJP, Zucker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702.

Albone ES, Shirley SG (1984) *Mammalian semiochemistry. The investigation of chemical signals between mammals.* Chichester: Wiley & Sons.

Arbeiter K, Barth U, Jochle W (1994) Observations on the use of progesterone intravaginally and of deslorelin sti in a cyclic mares for induction of ovulation. *J Equine Vet Sci* 14:21e5.

Arnold GW, Grassia A, (1982) Ethogram of agonistic behavior for thoroughbred horses. *Applied Animal Ethology* 8:5-25.

Asa CS (1986) Sexual behavior of mares. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2:519-534.

Asa CS, Goldfoot DA, Ginther OJ (1979). Sociosexual behavior and the ovulatory cycle of ponies (*Equus caballus*) observed in harem groups. *Horm Behav* 13:49-65.

Aurich C (2011) Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science* 124:220-228.

Bacchini A, Gaetani E, Cavaggioni A (1992) Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*. *Experienta* 48:419-421.

Bartos L, Bartosová J, Pluháček J, Sidelárova J (2011) Promiscuous behaviour disrupts pregnancy block in domestic horse mares. *Behav Ecol Sociobiol* 65:1567-1572.

Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed - effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67:1-48.

Beets M (1970) The molecular parameters of olfactory response. *Pharm Rev* 22:1-34.

Belluscio L, Koentges G, Axel R, Dulac C (1999) A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97:209-220.

Berger J (1977) Organizational systems and dominance in feral horses in the Grand Canyon. *Behav Ecol Sociobiol* 2: 131-146.

Berger J (1983) Induced abortions and social factors in wild horses. *Nature* 303:59-61.

Berger J (1986) *Wild Horses of the Great Basin: Social Competition and Population Size.* University of Chicago Press.

Bertmar G (1981) Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35:359-366.

Beynon RJ, Hurst JL (2003) Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, *Mus domesticus*. *Biochem Soc Trans* 31:142-146.

Böcskei Z, Groom CR, Flower DR, Wright CE, Phillips SEV, Cavaggioni A, Findlay JBC, North A.T (1992) Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* 360:186-188.

Booth WD (1984) Sexual dimorphism involving steroidal pheromones and their binding protein in the submaxillary salivary gland of the Göttingen miniature pig. *J Endocrinol* 100:195-202.

Boschat C, Pelofi C, Randin O, Roppolo D, Luescher C, Broillet MC, Rodriguez I (2002) Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat Neurosci* 5:1261-1262.

Bradshaw J, Cameron-Beaumont C (2000) The signaling repertoire of the domestic cat and its undomesticated relatives. In: Turner DC, Bateson P, editors. *The domestic cat: the biology of its behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press, 67-93.

Brechbühl J, Klaey M, Broillet MC (2008) Grueneberg ganglion Cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321:1092-1095.

Breer H, Fleischer J, Strotmann J (2006) The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci* 63:1465-1475.

Brennan PA, Keverne EB (2004) Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol* 14:R81-R89.

Brennan PA, Keverne EB (2004) Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol* 14:R81-R89.

Briand L, Huet JC, Perez V, Lenoir G, Nespoulous C, Boucher Y, Trotier D, Pernollet JC (2000) Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS Lett.* 476:179-185.

Brown RE, Macdonald DW (1985) *Social odours in mammals*. Vol 1 y 2, Oxford, Clarendon Press.

Bruce HM (1959) An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184:105.

Bruce HM (1960) A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *J Reprod Fertil* 1:96-103.

Buck LB (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annual Review of Neuroscience* 19:517-544.

Bulone V, Krogstad-Johnsen T, Smestad-Paulsen B (1998) Separation of horse dander allergen proteins by two-dimensional electrophoresis. Molecular characterisation and identification of Equ c 2.0101 and Equ c 2.0102 as lipocalin proteins. *Eur J Biochem* 253:202-211.

Burger D, Meuwly C, Thomas S, Sieme H, Oberthür M, Wedekind C, Meinecke-Tillmann S (2018) Cycle-specific female preferences for visual and non-visual cues in the horse (*Equus caballus*). *PLoS ONE* 13(2):e0191845.

Cavaggioni A, Findlay JBC, Tirindelli R (1990) Ligand binding characteristics of homologous rat and mouse urinary proteins and pyrazine binding protein of the calf. *Comp Biochem Physiol* 96:513-520.

Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C (2000) Major urinary proteins, R2U-globulins and aphrodisin, *Biochim Biophys Acta* 1482:218-228.

Choi GB, Stettler DD, Kallman BR, Bhaskar ST, Fleischmann A, Axel R (2011) Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. *Cell* 146:1004-1015.

Clayton HM, Lindsay FEF, Forbes AC, Hay LA (1981) Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. *Appl Anim Ethol* 7:169-174.

Crowell-Davis S, Houpt KA (1985) The ontogeny of flehmen in horses. *Anim Behav* 33:739-745.

Crowell-Davis SL (2007) Sexual behavior of mares. *Horm Behav* 52:12-17.

Cuervo-Arango J, Clark A (2010) The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare). *Anim Reprod Sci* 118:265e9.

D'Innocenzo B, Salzano AM, D'Ambrosio C, Gazzano A, Niccolini A, Sorce C, Dani FR, Scaloni A, Pelosi P (2006) Secretory Proteins as Potential Semiochemical Carriers in the Horse. *Biochem* 45:13418-13428.

Dagg AI, Taub A (1970) Flehmen. *Mammalia* 34:686-695.

Dandeu JP, Rabillon J, Carmi-Leroy A, Divanovic A, Camoin L, David B (1995) Equ c1, the horse major allergen and its close structural relationship to the mouse and rat major urinary protein. *J Allergy Clin Immunol* 95:348.

Dark GS (1975) Expressions of horses. Tesis, Southern Illinois University, Carbondale. Pp 48.

Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam, D, Wysocki CJ, Ogawa S, (2002) Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419:70-74.

Deshpande K, Furton KG, Mills DEK (2018) The equine volatilome: Volatile organic compounds as discriminatory markers. *Journal of Equine Veterinary Science* 62:47-53.

Distel H, Hudson R (1985) The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *J Comp Physiol A* 157:599-605.

Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP (1997) Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 49:53-62.

Dulac C, Axel R (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206.

Dulac C, Torello AT (2003) Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews* 4:551-562.

Ellard ME, Crowell-Davis SL (1989) Evaluating equine dominance in draft mares. *Applied Animal Behaviour Science* 24:55-75.

Estes RD (1972) The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia* 36:315-341.

Ewer RF (1968) *Ethology of Mammals*. New York: Plenum.

Feh C (1990) Long-term paternity data in relation to different aspects of rank for Camargue stallions, *Equus caballus*. *Anim Behav* 40:995-996.

Feh C (2005) Relationships and communication in socially natural horse herds. In Mills D, McDonnell S (Eds) *The Domestic Horse: The Evolution, Development and Management of its Behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp 83-93.

Feist JD, McCullough DR (1975) Reproduction in feral horses. *J Reprod Fertil* 23:13-18.

Feist JD, McCullough DR (1976) Behavior patterns and communication in feral horses. *Z Tierpsychol* 41:337-371.

Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC (1965) Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science* 149:981-982.

Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211-218.

Fleischer J, Breer H (2010) The Grueneberg ganglion: a novel sensory system in the nose. *Histol Histopathol* 25:909-915.

Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318:114.

Fräser AF (1968) *Reproductive Behavior of Ungulates*. Academic Press, London.

Gastal EL, Bergfelt DR, Nogueira GP, Gastal MO, Ginther OJ (1999) Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biol Reprod* 61:1492e8.

Gelez H, Fabre-Nys C (2004) The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav* 46:257-271.

Ginther IJ, Scraba ST, Nuti LC (1983) Pregnancy rates and sexual behavior under pasture breeding conditions in mares. *Theriogenology* 20:333-345.

Wells SM, von Goldschmidt-Rothschild B (1979) Social behaviour and relationships in a herd of Camargue horses. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 49:363-380.

Gregoire C, Rosinski-Chupin I, Rabillon J, Alzari PM, David B, Dandeu JP (1996) cDNA cloning and sequencing reveal the major horse allergen Eqc1 to be a glycoprotein member of the lipocalin superfamily. *J Biol Chem* 271:32951-32959.

Guarneros M, Sánchez-García O, Martínez-Gómez M, Arteaga L (2020) The underexplored role of chemical communication in the domestic horse, *Equus caballus*. *J Vet Behav* 38:89-95.

Halpern M, Jia C, Shapiro LS (1998). Segregated pathways in the vomeronasal system. *Microscopy Research and Technique* 41: 519-529.

Handler J, Schonlieb S, Hoppen HO, Aurich C (2006) Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone releasing device (PRIDTM) in mares. *Theriogenology* 65:1145e58.

Hanlon DW, Firth EC (2012) The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season. *Theriogenology* 77:952e8.

Hendriks WH, Moughan PJ, Tartelin MF, Woolhouse AD (1995) Felinine: a urinary amino acid of Felidae. *Comp Biochem Physiol* 112:581-588.

Henzel WJ, Rodriguez H, Singer AG, Stults JT, Macrides F, Agosta WC, Niall H (1988) The primary structure of aphrodisin, *J Biol Chem* 263:16682-16687.

Herrada G, Dulac C (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90:763-773.

Hoffmann R (1985) On the development of social behaviour in immature males of a feral horse population (*Equus przewalskii* f. *caballus*). *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 50:302-314.

Hothersall B, Harris P, Sörtoft L, Nicol CJ (2010) Discrimination between conspecific odour samples in the horse (*Equus caballus*). *App Anim Behav Sci* 126:37-44.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.052>

Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW (1972) Estrous cycles and ovulation in the mare. *J Am Vet Med Assoc* 161:1367-1374.

Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW (1975) The oestrous cycle of the mare. *J Reprod Fertil*: 23:161-166.

Hurst JL (1987) Behavioural variation in wild house mice (*Mus domesticus* Ruddy): a quantitative assessment of female social organization. *Anim Behav* 35:1846-1857.

Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DHL, Cavaggioni A, Beynon RJ (2001) Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414:631-634.

Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2003) Substances derived from 4-ethyl octanoic acid account for primer pheromone activity for the "male effect" in goats. *J Vet Med Sci* 65:1019-1021.

Izard MK, Vandenbergh JA (1982) The effects of bull urine on puberty and calving date in crossbred beef heifers. *J Anim Sci* 55:1160-1168.

Jacobson L (1813) Anatomisk Beskrivelse over et nyt Organ I Huusdyrenes Naerse. *Veterinaer-Selskapets Srifter* 2:209-246.

Jemiolo B, Harvey S, Novotny M (1986) Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci* 83:4576-4579.

Jirka M, Kotas J (1959) Some observations on the chemical composition of horse sweat. *J. Physiology* 147:74-77.

Johnson RP (1973) Scent marking in mammals. *Anim Behav* 21:521-535.

Johnston RE (1977) The causation of two scent-marking behaviour patterns in female hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anim Behav* 25:317-327.

Johnston RE (1979) Olfactory preferences, scent marking, and 'proceptivity' in female hamsters. *Hormones and Behavior* 13:21-39.

Johnston RE (1986) Effects of female odors on the sexual behavior of male hamsters. *Behavioral and Neural Biology* 46:168-188.

Johnston RE (2000) Chemical communication and pheromones: the types of chemical signals and the role of the vomeronasal system. In: Finger TE, Silver WL, Restrepo D, editors. *The neurobiology of taste and smell*. New York: Wiley-Liss 101-127.

Johnston RE, del Barco-Trillo J (2009) Communication by chemical signals: Behavior, social recognition, hormones and the role of the vomeronasal and olfactory systems. En Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (Eds) *Hormones, brain and behavior*. Elsevier Academic Press, Pp 395-440.

Jordan WC, Bruford MW (1998) New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81:239-245.

Karlson P, Lüscher M (1959) "Pheromones"; a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 1959; 183:55-56.

Kaseda Y, Kahlil AM, Ogawa H (1995) Harem stability and reproductive success of Misaki feral mares. *Equine Veterinary Journal* 27:368-372.

Kavaliars M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc R Soc L* 261:31-35.

Kiley-Worthington M (1987) *The behaviour of horses: In relation to their training and management*. JA Allen, London, pp. 21-24.

Kimoto H, Haga S, Sato K, Touhara K (2005) Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437:898-901.

Kimura R (2001) Volatile substances in feces, urine and urine-marked feces of feral horses. *Can J Anim Sci* 81:411-420.

Kirkpatrick JF, Turner JW Jr (1991) Change in herb stallion among feral horse bands and the absence of forced copulation and induced abortion. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 29:217-219.

Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2007) Removal of the vomeronasal organ blocks the stress-induced hyperthermia response to alarm pheromone in male rats. *Chem Senses* 32:57-64.

Klingel H (1975) Social organization and reproduction in equids. *Journal of Reproduction and Fertility* 23:7-11.

Klingel H (1982) Social organization of feral horses. *Journal of Reproduction and Fertility* 32:89-95.

Kratzing J (1971) The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *Journal of Anatomy* 108:247-260.

Krieger J, Schmitt A, Löbel D, Gudermann T, Schultz G, Breer H et al. (1999) Selective activation of G protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds. *J Biol Chem* 274:4655-4662.

Krueger K, Flauger B (2011) Olfactory recognition of individual competitors by means of faeces in horse (*Equus caballus*). *Anim Cogn* 14:245-257.

Ladewig J, Hart BL (1980) Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiology and Behavior* 24:1067-1071.

Lanuza E, Novejarque A, Martínez-Ricós J, Martínez-Hernández J, Agustín-Pavón C, Martínez-García F (2008) Sexual pheromones and the evolution of the reward system of the brain: the chemosensory function of the amygdala. *Brain Res Bull* 75:460-466.

Lascombe M, Gregoire C, Poncet P, Tavares G, Rosinski-Chupin I, Rabillon J, et al. (2000) Crystal structure of the allergen Eqc 1: A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem* 275:21572-21577.

Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT, Zufall F (2000) Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405:792-796.

Lemasson A, Remeuf K, Trabalon M, Cuir F, Hausberger M (2015) Mares prefer the voices of highly fertile stallions. *PLoS ONE* 10:e0118468.

Liberles SD, Horowitz LF, Kuang D, Contos JJ, Wilson KL, Siltberg-Liberles J, Liberles DA, Buck LB (2009) Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proc Natl Acad Sci* 106:9842-9847.

Licht G, Meredith M (1987) Convergence of main and accessory olfactory pathways on to single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res* 69:7-18.

Lie H, Mooney R, Katz LC (2006) Synaptic integration of olfactory information in mouse anterior olfactory nucleus. *J Neurosci* 26:12023-12032.

Lindsay FE, Burton FL (1983) Observational study of "urine testing" in the horse and donkey stallion. *Equine Vet J* 15:330-336.

Loebel D, Scaloni A, Paolini S, Fini C, Ferrara L, Breer H, Pelosi P (2000) Cloning, post-translational modifications, heterologous expression and ligand-binding of boar salivary lipocalin. *Biochem J* 350:369-379.

- Luo M, Fee MS, Katz LC (2003) Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299:1196-1201.
- Ma M (2007) Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42:463-480.
- Ma W, Klemm WR (1997) Variations of equine urinary volatile compounds during the oestrous cycle. *Vet Res Comm* 21:437-446.
- Mamasuew K, Hofmann N, Breer H, Fleischer J (2011) Grueneberg ganglion neurons are activated by a 505 defined set of odorants. *Chem Senses* 36:271-282.
- Marchese S, Pes D, Scaloni A, Carbone V, Pelosi P (1998) Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones, *Eur J Biochem* 252:563-568.
- Marinier SL, Alexander AJ, Waring GH (1988) Flehmen behaviour in the domestic horse: discrimination of conspecific odours. *App Anim Behav Sci* 19:227-237.
- Martínez-García F, Novejarque A, Lanuza E (2008) Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain Res Bull* 75:206-213.
- Martinez-Marcos A (2009) On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Progr Neurobiol* 87:21-30.
- Masini CV, Garcia RJ, Sasse SK, Nyhuis TJ, Day HE, Campeau S (2010) Accessory and main olfactory systems influences on predator odor-induced behavioral and endocrine stress responses in rats. *Behav Brain Res* 207:70-77.
- McCort WD (1984) Behavior of feral horses and ponies. *J Anim Sci* 58:493-499.
- McCue PM (2003) Induction of ovulation. En Robinson NE (edit) *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia, Saunders, 5th ed., Pp. 240e2.
- McDonnell SM (2003) *The equid ethogram: a practical field guide to horse behavior*. Eclipse Press, Lexington KY.
- McDonnell SM (2005) Sexual Behaviour. En Mills DS, McDonnell S (Eds) *The Domestic Horse*. Cambridge University Press. Pp 110-125.
- McKinnon AO, Nobelius AM, Tarrida del Marmol Figueroa S, Skidmore J, Vasey JR, Trigg TE (1993) Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. *Equine Vet J* 25:321-323.
- McKinnon AO, Vasey JR, Lescun TB, Trigg TE (1996) Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. *Equine Vet J* 29:153-155.

Meredith M (1980) The vomeronasal organ and accessory olfactory system in the hamster. In: Müller-Schwarze D, Silverstein RM (eds.) *Chemical Signals: Vertebrates and Aquatic Invertebrates*, pp. 303-326. New York: Plenum Press.

Meredith M (1991) Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:601-614.

Meredith M (1994) Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol Behav* 56:345-354.

Meredith M, Marques DM, O'Connell RJ, and Stern FL (1980) Vomeronasal pump: Significance for male hamster sexual behavior. *Science* 207:1224-1226.

Meredith M, O'Connell RJ (1979). Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol* 286 .301-316.

Michael RP, Keverne EB (1968) Pheromones in the communication of sexual status in primates. *Nature* 218:746-749.

Miller R (1981) Male aggression, dominance and breeding behavior in Red Desert feral horses. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 57:340-351.

Miller R, Denniston R (1979) Interband dominance in feral horses. *Z Tierpsychol* 51: 41-47.

Miller R, Denniston R (1979) Interband dominance in feral horses. *Z Tierpsychol* 51: 41-47.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmonson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.

Mozūraitis R, Būda V, Kutrad J, Borg-Karlson A (2012) p- and m-Cresols emitted from estrous urine are reliable volatile chemical markers of ovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 130:51-56.

Mucignat-Caretta C, Redaelli M, Caretta A (2012) One nose, one brain: contribution of the main and 532 accessory olfactory system to chemosensation. *Front Neuroanat* 6:1-9.

Mykytowycz R (1965) Further observations on the territorial function and histology of the submandibular cutaneous (chin) glands in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Animal Behaviour* 13:400-412.

Mykytowycz R, Gambale S (1969) The distribution of dunghills and the behaviour of free-living rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), on them. *Forma et Functio* 1:333-349.

Nagy P, Guillaume D, Daels P (2000) Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science* 60-61:245-262.

Nodari F, Hsu FF, Fu X, Holekamp TF, Kao LF, Turk J (2008) Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons. *J Neurosci* 28:6407-6418.

Pal SK (2003) Urine marking by free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to sex, season, place and posture. *App Anim Behv Sci* 80:45-59.

Parkinson TJ, Morrell JM (2019) 43 Artificial Insemination. Noakes DE, Parkinson TJ, England GWC (Editors) *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (Tenth Edition) W.B. Saunder, pp 746-777.

Pelosi P (2001) The role of the perireceptor events in vertebrates olfaction. *Cell Mol Life Sci* 58:503-509.

Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13:391-396.

Péron F, Ward R, Burman O (2014) Horses (*Equus caballus*) discriminate body odour cues from conspecifics. *Anim Cogn* 17:1007-1011.

Petter JJ (1965) The lemurs of Madagascar. En Devore I (Ed) *Primate Behavior*. Holt, Rinehart and Winston. New York. Pp. 292-319.

Pickerel TM, Crowell-Davis SL, Caudle AB, Estep DQ (1993) Sexual preferences of mares (*Equus caballus*) for individual stallions. *Appl Anim Behav Sci* 38:1-13.

Poole T (1985) *Social Behaviour in Mammals*. Blackie, New York, Pp 248.

R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, Retrieved from www.R-project.org.

Reece-Engel C (1988) Female choice of resident male rabbits *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 36:1241-1242.

Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO (2001) The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 65:157-170.

Rich TJ, Hurst JL (1998) Scent marks as reliable signals of the competitive ability of mates. *Anim Behav* 56:727-735.

Rich TJ, Hurst JL (1999) The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav* 58:1027-1037.

Robertson DHL, Beynon RJ, Evershed RP (1993) Extraction, characterization and binding analysis of two pheromonally active ligands associated with major urinary protein of house mouse (*Mus musculus*). *J Chem Ecol* 19:1405-1416.

Rodriguez I, Feinstein P, Mombaerts P (1999) Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97:199-208.

Rodríguez I, Greer CA, Mok MY, Mombaerts P (2000) A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nat Genet* 26:18-19.

Rubenstein DI, Hack MA (1992) Horse signals-the sounds and scents of fury. *Evolutionary Ecology* 6:254-260.

Rubenstein DI (1981) Behavioural ecology of island feral horses. *Equine Vet J* 13:27-34.

Salter RE (1978) Ecology of feral horses in western Alberta. MS Thesis, University of Alberta, Edmonton. Pp 62.

Salter RE, Hudson RJ (1982) Social organization of feral horses in western Canada. *Appl Anim Ethol* 8:207-223.

Samper JC (2001) Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci* 68:219-228.

Samper JC (2008) Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 70:445-447.

Samper JC, Jensen S, Sargent J, Ruth L (2002) Timed ovulation in mares using the Deslorelin implant Ovuplant. *Equine Vet J* 65:121-124.

Shaw PH, Held WA, Hastie ND (1983) The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell* 32:755-761.

Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161:31-56.

Scaloni A, Paolini S, Brandazza A, Fantacci M, Bottiglieri C, Marchese S, Navarrini A, Fini C, Ferrara L, Pelosi P (2001) Purification, cloning and characterization of odorant-binding proteins from pig nasal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 58:823-834.

Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Semon E, Perrier G (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424:68-72.

Schewende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M, Novotny M (1986) Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *Journal of Chemical Ecology* 12:277-296.

Schneider KM (1930) Das Flehmen. *Zool Gart Lpz* 3:183-198.

Schummer A, Nickel R, Sack WO (1979) *The Viscera of the Domestic Mammals*. New York: Verlag Paul Parey.

Shahan KM, Denaro M, Gilmartin M, Shi Y, Derman E (1987) Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary and lachrymal glands and in the liver. *Mol Cell Biol* 7:1947-1954.

Shepherd GM (1988) *Neurobiology*. 2nd Edit. New York, NY, Oxford University Press.

Singer AG, Macrides F (1990) Aphrodisin: pheromone of transducer? *Chem Senses* 15:199-204.

Singer AG, Macrides F, Clancy AN, and Agosta WC (1986) Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *Journal of Biological Chemistry* 261:13323-13326.

Smith F (1888) Histology of the skin of the horse. *J Anat Physiol* 22:142-153.

Smith F (1890) Note on the composition of the sweat of the horse. *J Physiol* 11:497-501.

Spinelli S, Vincent F, Pelosi P, Tegoni M, Cambillau C (2002) Boar salivary lipocalin. Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *Eur J Biochem* 269:2449-2456.

Stahlbaum CC, Houpt KA (1989) The role of the flehmen response in the behavioral repertoire of the stallion. *Physiol Behav* 45:1207-1214.

Sun L and Müller-Schwarze D (1999) Chemical signals in the beaver: One species, two secretions, many functions. En Johnston RE, Muller-Schwarze D, Sorensen PW (eds) *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*, Vol. 8, New York: Plenum Press. Pp 281-288.

Swanson LW, Petrovich, G.D. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.

Tembock G (1968) *Animal Communication*. Indiana University Press, Bloomington, Pp 338-404.

Trinh K, Storm DR (2003) Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci* 6:519-525.

Trotier D, Doving KB (1998) Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chem Senses* 23:743-754.

Turner JW, Kirkpatrick JF (1986) Fertility control as a management tool for feral horse populations. *Journal of Equine Veterinary Science* 6:278-284.

Turner JW, Perkins A, Kirkpatrick JF (1981) Elimination marking behavior in feral horses. *Can J Zool* 59:1561-1566.

Tyler SJ (1972) The behaviour and social organization of the New Forest ponies. *Anim Behav Monogr* 5:85-196.

Walther FR (1984) *Communication and Expression in Hoofed Mammals*. Indiana University Press, Bloomington, Pp 423.

Waring GH (2003) *Horse Behavior*. 2nd Edit, Elsevier.

Waring GH, Wierzbowski S, Hafez ESE (1975) The behaviour of horses. En Hafez ESE (ed) *The behaviour of domestic animals*. 3rd edition, Baillière Tindall, London. Pp. 330-369.

Watson ED (1998) Reproduction. En Mair T, Love S, Schumacher J, Watson E (eds) *Equine medicine, surgery and reproduction*. W.B. Saunders, Philadelphia Pp 278-309.

Weeks JW, Crowell-Davis SL, Heusner G (2002) Preliminary study of the development of the Flehmen response in *Equus caballus*. *Applied Animal Behaviour Science* 78:329-335.

Welsh D (1975) Population behavioural and grazing ecology of the horses of Sable Island, Nova Scotia. PhD dissertation. Dalhousie University, Halifax.

Welsh DA (1973) The life of Sable Island's wild horses. *Nature Canada* 2:7-14.

Wilson EO (1963) Pheromones. *Sci Am* 208:100-114.

Winans SS, Scalia F (1970) Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science* 170:330-332.

Wysocki CJ (1979) Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev* 3:301-341.

Wysocki CJ, Meredith M (1987) The vomeronasal system. In: Finger TE and Silver WL (eds.) *Neurobiology of Taste and Smell*, pp. 125-150. New York: Wiley.

Wysocki CJ, Wellington JL, Beauchamp GK (1980) Access of urinary non-volatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science* 207:781-783.

Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, Rothman DL, Hyder F, Restrepo D, Shepherd GM (2005) Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 489:491-500.

Yamazaki K, Beauchamp GK, Shen FW, Bard J, Boyse EA (1994) Discrimination of odortypes determined by the major histocompatibility complex among outbred mice. *Proc Natl Acad Sci* 91:3735-3738.

Zeng C, Spielman A, Vowels BR, Leyden J, Biemann K, Preti G (1996) A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. Proc Nat. Acad Sci 93:6626-6630.