



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona

# ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO DEL ESTRÉS Y EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN GANADO PORCINO

Tesis Doctoral

Laura Arroyo Sánchez

Directora

Anna Bassols i Teixidó

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2017





Universitat Autònoma de Barcelona

# ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO DEL ESTRÉS Y EL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN GANADO PORCINO

Memoria realizada por  
Laura Arroyo Sánchez  
para optar al título de Doctora

Tesis realizada bajo la dirección de la catedrática Anna Bassols i Teixidó en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

Laura Arroyo Sánchez

Anna Bassols i Teixidó

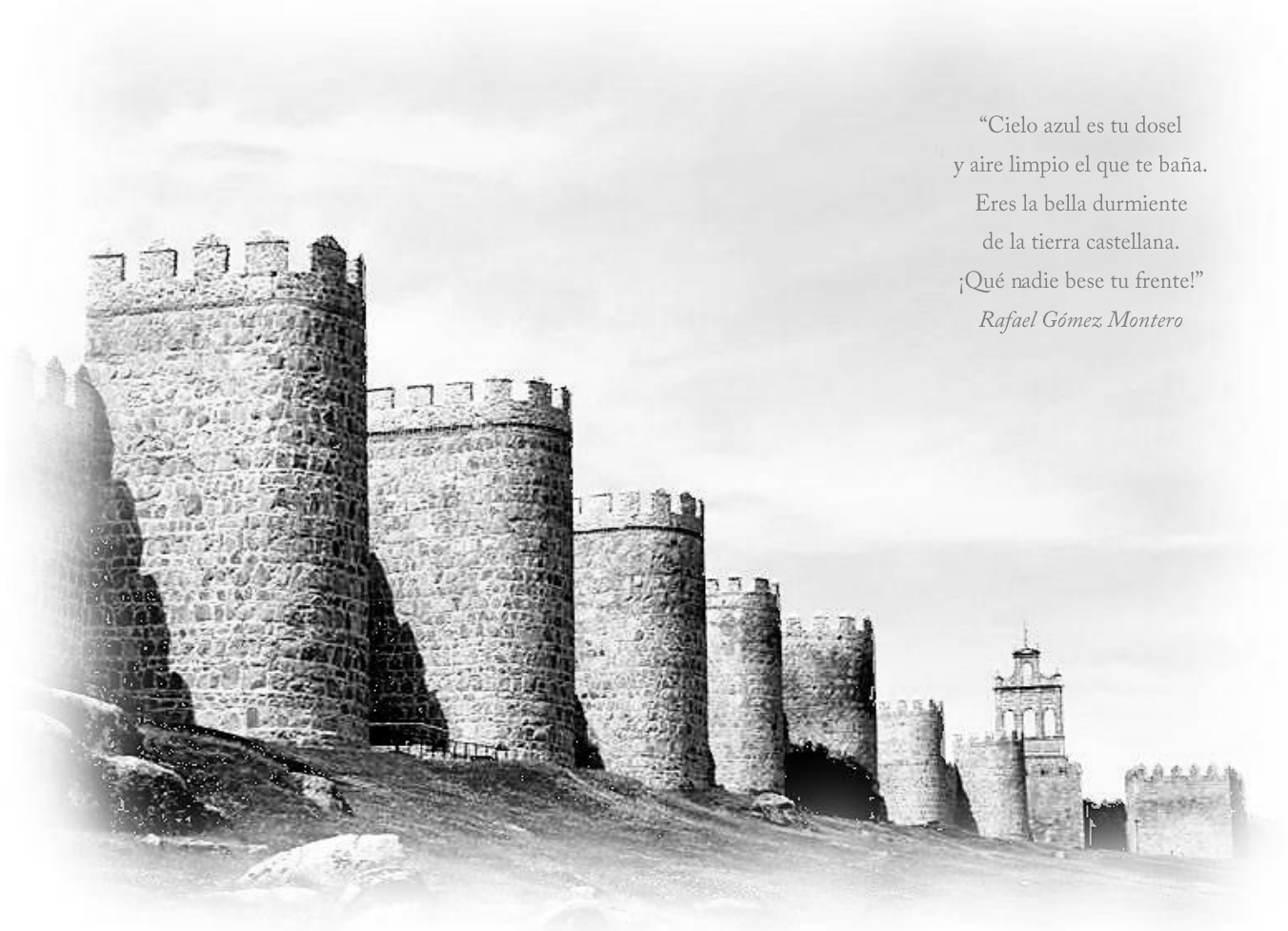
Bellaterra, Julio de 2017



*A mis padres*  
*A mi hermano*

“Cielo azul es tu dosel  
y aire limpio el que te baña.  
Eres la bella durmiente  
de la tierra castellana.  
¡Qué nadie bese tu frente!”

*Rafael Gómez Montero*





La vida consiste en miles de aventuras que nunca sabemos cómo ni por dónde empezar y siempre nos lamentamos cuando acaban. Como esta. Un lamento de la nostalgia y una alegría de mirar hacia delante. Sabíamos que no iba a ser fácil, conocidas son las odiseas de esto de hacer un Doctorado, pero para que negar que ha sido placentero, y sobre todo muy fructífero. Las cualidades científicas adquiridas quedarán a valoración de un tribunal, de un compañero, de un jefe o de un técnico de recursos humanos, pero en lo personal solo existe la autorreflexión. Quizás si mi yo de hoy volviera al inicio, muchas cosas serían diferentes, pero también un doctorado sirve para esto: para madurar y crearte, para dejar atrás odios y complejos y poder perfilar sonrisas más nítidas, y sentirme orgullosa de qué y cómo soy a día de hoy; para perder el miedo a no saber una respuesta y a pedir ayuda ante problemas que no sabes ni formular la pregunta; para ayudar y enseñar todo lo que pudiera dar; para confiar en los demás, pero sobre todo en mí. Y por encima de todo he aprendido a disfrutar de los pequeños momentos, y apartar tropiezos y rasguños empapándome de la satisfacción de los experimentos que salían bien, de los mensajes de la muestra ha sido procesada o de lanzar código a algún programa estadístico sin ningún error. Ahí reside la vida y los recuerdos, en las luces verdes que nos permiten avanzar.

Pero dejémonos de mí, esto es para vosotros. Y aquí la casa se empieza por los cimientos que me permitieron empezar esta locura, y por las puertas abiertas que en su día me brindó **Anna Bassols**. Mucha de la confianza que he ganado en mí es toda tuya porque pocas personas tienen la habilidad de hacerte sentir capaz de lo que te propongas y respaldado, a la vez que te mantiene en vereda sin utilizar ninguna vara. Lo de la parte científica lo doy más que por obvio.

E inmediatamente después “mi jefa”, **Anna Marco**. Más que evidente es que si no te hubieras cruzado en mi camino hoy no estaría aquí. Me enseñaste, literalmente, todo lo que sé. Me formaste como científica, como compañera y como “jefa”. Y también a **María José**, por los años intermitentes compartidos y ser todo un ejemplo de inteligencia, calma y saber hablar para decir lo realmente importante. Es una suerte que me encontrara con dos compañeras como vosotras para empezar esto.

A toda la gente del departamento. Los *jefes* Antonio, Joaquín y Néstor; las chicas de arriba **Raqueles** y **Yolanda**, preparaos que os toca sufrirme más; a los “**Ariño**”, que nos debemos más cerveceos comunes; a **Rosita** que tantos “buenos días” nos da; a **Vilalta**, única e inigualable, mi obsesión era irme antes que tú por temor a que se hundiera el barco, Pepi se encargará de mantenerlo a flote; a todos los chiquitos de prácticas que me han sufrido directa o indirectamente, vuestra colaboración es más que inestimable; y a la actualidad de los doctorandos **Kuai** y **Dani** (te quedan unas pocas más apariciones por aquí), y la que empieza **Natalia**.

A todos los individuos de la facultad con los que me he llegado a cruzar, incluso a los que no saludáis, eh? Sobre todo a **Santi** por los *cafeses*, las cervezas, los *chupachuses* y todo el mimo que derrochas. ¡Y a todo el personal del bar!

Ah, hablando de bares, Nicomedes García me has hecho perder más de una neurona, y me has causado más de un dolor de cabeza, pero ahogarme en tu legado me ha permitido resurgir. Y oye, que hay cosas que mejor olvidar, un bizcochito cura como mercromina. Nadie entiende nuestro amor, pero somos “gente sin complejos”.



Y seguimos con los bares y los cierra bares. Al equipo Vilero titular, los de los jueves (o cuando sea) locos, los mejores clientes. **Dani** alias *Riverita, va-lent, Lazarillo* o *El hombre de negro*, estás por todos lados, aunque solo te acuerdes de los últimos 10 años los documentos gráficos nos unen desde hace más de 20, ¡qué te voy a decir! **Lourdes** alias *Venenillo*, te nombro oficialmente como mi alumna preferida, es difícil congeniar con alguien tan rápido, tan breve. **Néstor** alias *Er capo*, tot i que em recriminis que sigui del Madrid, que mengi molt, que tingui papada, em cridis “qué te calles!”, m’has fet oficialment “Pubilla de l’Empordà”, ¿qué más se puede pedir? Ah sí, que no cantéis nunca más “Balada triste”, por favor. Maribel *y sus aventones*, eres el entretenimiento asegurado y una gran filosofía de vida, de corazón. **Natalia** *Verbeke* alias *Natividad del Señor*, la última en llegar y la última en quedarse, que bien has caído entre nosotros, tranquila que no te libras de mí, nos queda mucho por bien vivir. Y todos aquellos que nos han acompañado alguna vez, especialmente a **Albertito** por tanta charlita intensa. Se nos va de las manos siempre, no os sintáis culpables. ¡Qué empiece la producción artesanal!

Al **HPLC** team. Ahora parece todo muy sencillo, pero solo las que estuvimos en el inicio nos acordaremos de las horas invertidas! A Mercedes Unzeta por el equipo, a Pepi Sabrià por la sabiduría (y por el agradecimiento del Máster que te debo), y a Susana Benítez por el todo! El mimo, la dedicación, la entrega, el conocimiento. Nuestro bicho sin ti no funcionaría, es evidente.

A la gente del **IRTA**, que con tanto mimo, y es literal, cuidaron a nuestros gorrinos. Ricard, Toni, Eva y demás personal de granja. Agustí y el carnicero por los hachazos bien dados, y el crujir de los cráneos al que me volví adicta.

A las chicas del **IRB** por el último apretón apurado de tiempo. Hemos parido el iTRAQ entre todas. Y el tejado, porque sois mi refugio:

Los compis de la época universitaria. Mi *biotec* preferida, **Txell**, porqué estudiar una carrera contigo fue mucho más fácil. Mis chicas del **H011**: Judit, Yoli y Lau. A pesar de las neuronas perdidas entre El Cau de la Vila, el Frankfurt, Mundo Caníbal y la Zona hermética y de esta cabecita (o cabezona) loca, vivimos la vida universitaria como todo el mundo desearía vivir. Tuvimos todo matrículas de honor en eso de vivir, éramos el *Dream Team* de la época. Ah, y por las noches en vela en la biblioteca.

Als compis de **l’Empordà**: Guerre, Yosú, Júlia, **Núri**, **Marina**, **Font** y Dani; y arrimaos y descendientes. Sois la calma, y la locura. Los viernes locos, las cañas que se van de las manos, los viajes comprimidos, la Costa Brava en intensidad, y en inmensidad, las confesiones, la vida. Y casi ni puedo describiros más porqué esta recta final me ha llevado al abandono. Os debo una cena por tanta paciencia.

Mis pueblerinos, esa vida de siempre. A pesar de la distancia, es imposible no teneros presentes en los puntos y a parte de la vida. Los **Ases de Copas** en general. Los de siempre en especial: Kike, Juanma, Carlos, Dani, Javi, Juli, Germán etc. Mis chicas especiales, **Lucía**, **Mari** e **Inma**, que con una mirada sabemos que estamos ahí, sois imprescindibles. Los no Ases, **Rubi** y **Pablo**, porque sois mis más fieles compañeros a dosis equilibradas de deporte y Mahous. Y a todo **Navatalgordo** sin excepciones ni edades, porqué cada instante en el sitio de nuestro recreo nos saca brillo al alma. ¡Y a todas las **Navas** por tantas aventuras! Ávila mola, pero el **Alto Alberche** es incomparable.

A los **Arroyo** crecidos y salvajes. ¡Qué familia esta mía! ¡Qué abuela! ¡Qué tíos! ¡Qué tías! ¡Qué primos! ¡Y qué prima! La crème de la crème de **Navarredondilla**. Y disculpadme, pero el vínculo es especial. A **Isa** por ser el espejo en el que mirarme, y a mis ahijados bonitos **Martín y Alonso**, esto tiene los mismos años que vosotros.

A los **Sánchez**. Y a los que tiramos más para los Blázquez. Porqué digan lo que digan, somos de lo mejorcito. Aurea y Silvestre, 7 hermanos y 17 primos. Con sus respectivos y sus criaturas. Sobre todo para **Resti**, porqué eres lo más parecido a un abuelo que he tenido en los últimos 15 años, y si canto mucho, que te pidan explicaciones a ti. Y a los cantarines de Nochevieja. Y a las **primas locas**. Por recogerlos en todas las caídas. Hemos bailado y reído en noches cíclicas interminables, y hemos roto más vasos que platos. Hemos aprendido del sufrimiento de los **primos reshus** y a veces se nos olvida pero aprendimos a vivir muy bien. **Cris**, te has convertido en una hermana, y tu generosidad y honestidad, en todos los sentidos, me sigue sorprendiendo cada día. ¡Y lo *grupis* que somos también! Con **Pablo**, cuanta vida ganada en las salas, y los festivales que nos quedan. Un concierto improvisado de nuestros Supersubmarina nos creó, aunque ahora les sople el viento de cara muy fuerte. ¡Volved, por favor!

A todos los naufragios, sonrisas, cervezas, bailes y aires compartidos. Sin cada instante de vida no seríamos ni la sombra de lo que somos. Sin las locuras ni los rasguños viviríamos con una mochila vacía.

Pero podría borrar todo lo anterior y no estaría cometiendo ninguna locura. **Rodrigo**, un eterno compañero de vida que me ha ido abriendo camino sin cesar, y lo seguirá haciendo. Siendo una copia femenina de ti, aunque solo lo fuera al 50% de todas tus capacidades sería muy grande. ¡Eres un genio, hermano!

Y esto es, ante todo, por, para y de **mis padres**. No hay orgullo mayor que el que siento de saber que no me podríais haber dado nada mejor, que habéis vivido por y para nosotros y que cualquier pequeño logro que alcancemos en la vida será la manera de querer devolveros todo lo que nos disteis, aun cuando teníais poco. Cuando vinisteis a este rincón de mundo soltando las raíces que os alimentaban por querer darnos unas mejores a nosotros, pero sin permitirnos olvidar las originales. Quizás no os lo he dicho nunca (los Sánchez somos así, y los Arroyo), pero *sus* quiero.



Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-30598-C03-02 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



# ÍNDICE`

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	VII
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	XI
<b>RESÚMENES</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1. Estrés .....	11
2. Clasificación de los estímulos estresantes .....	11
2.1. Estímulos emocionales .....	13
3. Integración de estímulos en el SNC .....	14
4. Respuesta endocrina al estrés .....	16
4.1. Eje HPA .....	16
4.1.1. Regulación endocrina del eje HPA.....	16
4.1.2. Regulación neuronal del eje HPA.....	17
5. Monoaminas transmisoras .....	19
5.1. Catecolaminas.....	19
5.1.1. Biosíntesis y degradación .....	19
5.1.2. Tipos de receptores.....	20
5.1.3. Sistema dopaminérgico.....	21
5.1.4. Sistema noradrenérgico .....	22
5.2. Serotonina .....	24
5.2.1. Biosíntesis y degradación .....	24
5.2.2. Tipos de receptores.....	25
5.2.3. Sistema serotoninérgico .....	25
5.2.4. Señalización y efectos de los receptores .....	27
6. Factores neurotróficos.....	28
7. Bienestar animal y estrés .....	29
7.1. Causas del estrés en producción porcina.....	30
7.2. Marcadores de bienestar y estrés animal .....	30
7.3. Enriquecimiento ambiental.....	32

8. Proteómica en cerebro .....	34
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	37
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	41
<b>MATERIAL</b> .....	43
1. Determinación de parámetros bioquímicos mediante analizador automático.....	43
2. ELISAs comerciales.....	43
3. Anticuerpos.....	44
<b>MÉTODOS</b> .....	45
1. Manejo de los animales .....	45
2. Obtención y procesamiento de las muestras .....	45
2.1. Saliva .....	45
2.2. Suero.....	45
2.2.1. Extracción de catecolaminas séricas .....	45
2.3. Muestras cerebrales .....	46
2.3.1. Preparación extracto cerebral para la determinación de NT .....	47
2.3.2. Preparación extracto cerebral para la determinación de proteínas y NT .....	48
3. Determinación de neurotransmisores .....	48
3.1. Sistema HPLC .....	48
3.2. Procesamiento de las muestras .....	49
4. Cuantificación de proteínas: método de Bradford.....	49
5. Electroforesis y <i>Western Blot</i> .....	49
5.1. Preparación de la muestra .....	50
5.2. Electroforesis SDS-PAGE.....	50
5.3. Western blot .....	50
6. Oxy-blot off-gel mediante slot blot.....	51
7. Ensayo de peroxidación lipídica .....	51
8. Análisis del proteoma de hipocampo mediante marcaje isobárico iTRAQ .....	52
8.1. Preparación de la muestra .....	52

8.2.	Cuantificación de proteínas .....	52
8.3.	Reducción, alquilación y tripsinización .....	52
8.4.	Marcaje isobárico de los péptidos.....	53
8.5.	Cuantificación e identificación .....	53
8.6.	Análisis estadístico.....	54
<b>RESULTADOS</b> .....		55
<b>CAPÍTULO 1</b> .....		57
1.	Diseño experimental .....	57
2.	Análisis estadístico .....	58
2.1.	Estadística univariante .....	58
2.1.1.	Muestras de suero.....	58
2.1.2.	Neurotransmisores .....	58
2.2.	Análisis factorial.....	59
2.2.1.	Análisis factorial del perfil NT regional .....	59
2.2.2.	Análisis factorial general .....	59
3.	Perfil Bioquímico .....	60
4.	Perfil de NT en las distintas áreas cerebrales.....	64
4.1.	Niveles de NT monoaminérgicos y sus metabolitos en amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo.....	64
4.2.	Influencia del sexo y genotipo halotano en los niveles de NT.....	66
5.	Perfil multivariante .....	68
<b>CAPÍTULO 2</b> .....		73
1.	Test de inmovilidad tónica.....	74
2.	Diseño experimental .....	74
3.	Análisis estadístico .....	76
3.1.	Estadística univariante .....	76
4.	Perfil bioquímico .....	76
5.	Perfil de NT .....	77
5.1.	Influencia del fenotipo miedoso frente a un manejo estresante .....	80



<b>CAPÍTULO 3</b> .....	83
1. Diseño experimental .....	84
2. Análisis estadístico .....	85
2.1. Estadística univariante .....	86
2.2. Correlaciones .....	86
2.3. Estadística Multivariante .....	86
3. Perfil Bioquímico .....	87
4. Perfil de NT en la PFC y el hipocampo. ....	89
4.1. PFC .....	89
4.2. Hipocampo .....	90
4.3. Marcadores moleculares de estrés en la PFC y el hipocampo: c-Fos, ERK1/2 y carbonilación de proteínas .....	93
4.4. BDNF en Hipocampo .....	95
4.5. Análisis Multivariante .....	96
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	99
1. Diseño experimental .....	100
2. Análisis estadístico .....	101
2.1. Muestras de suero .....	101
2.2. Muestras medidas solo en el sacrificio .....	101
2.3. Correlaciones .....	102
3. Perfil Bioquímico .....	102
4. Marcadores de estrés oxidativo .....	106
5. Perfil de NT en las distintas áreas cerebrales .....	107
6. Marcadores moleculares de estrés en la PFC y el hipocampo: c-Fos, ERK1/2 y BDNF .....	110
7. Análisis del efecto del entorno en el proteoma del hipocampo mediante iTRAQ .....	111
<b>DISCUSIÓN</b> .....	117
1. Perfil bioquímico en el suero .....	120
2. Perfil en el SNC .....	124
2.1. Neurotransmisores monoaminérgicos .....	124

2.1.1. Sexo y genotipo halotano.....	125
2.1.2. Estrés por manejo en el matadero .....	126
2.1.3. Alojamiento y estrés por transporte.....	128
2.1.4. Enriquecimiento ambiental .....	129
2.2. Marcadores moleculares de estrés, estrés oxidativo y BDNF en SNC: EE y estrés.....	131
3. Integración del perfil del suero y del SNC.....	133
4. Cambios proteómicos asociados al EE.....	136
4.1. Proteínas ribosomales.....	137
4.2. Formación de microtúbulos/Proteínas estructurales de citoplasma .....	138
4.3. Proteínas del metabolismo energético.....	139
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>145</b>
<b>APÉNDICE 1 .....</b>	<b>161</b>
<b>APÉNDICE 2 .....</b>	<b>165</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

Figura 1. Esquema de la relación entre las estructuras cerebrales implicadas en la regulación y respuesta a estímulos. ....	15
Figura 2. Representación de la respuesta al estrés del eje HPA. ....	18
Figura 3. Vía biosintética de las catecolaminas.....	20
Figura 4. Proyecciones dopaminérgicas en el cerebro.....	22
Figura 5. Proyecciones noradrenérgicas en el cerebro.....	23
Figura 6. Vía de síntesis de las indolaminas. ....	25
Figura 7. Proyecciones serotoninérgicas en el cerebro. ....	26
Figura 8. Causantes de estrés o pobre bienestar en ganado porcino y marcadores. ....	32
Figura 9. Esquema general de un espectrómetro de masas. ....	34
Figura 10. Esquema de la cuantificación relativa por iTRAQ. ....	35
Figura 11. Disección SNC .....	47
Figura 12. Representación gráfica de los efectos significativos del sacrificio en parámetros del suero para el primer estudio.....	61
Figura 13. Representación gráfica de los efectos significativos del sexo en parámetros del suero para el primer estudio.....	62
Figura 14. Representación gráfica de los efectos significativos del sexo para el primer estudio. ....	62
Figura 15. Representación gráfica de las concentraciones de glucosa y triglicéridos en el primer estudio.....	63
Figura 16. Representación gráfica de la concentración de Pig-MAP en el primer estudio.....	64
Figura 17. Representación gráfica de las puntuaciones otorgadas a cada región de cada animal para los dos factores extraídos en el PCA. ....	66
Figura 18. Representación gráfica de las puntuaciones otorgadas en el PCA a cada individuo para cada factor en el primer estudio .....	71
Figura 19. Diagrama explicativo de los animales y condiciones del segundo estudio .....	75
Figura 20. Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en la amígdala para el segundo estudio. ....	78
Figura 21. Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en la PFC para el segundo estudio. ....	79
Figura 22. Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en el hipotálamo para el segundo estudio.....	80
Figura 23. Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo según la clasificación para el TI en el segundo estudio. ....	82

Figura 24. Cronograma de los tratamientos realizados en el capítulo 3.....	85
Figura 25. Representación gráfica de la actividad de la CK y la concentración de Hp en el tercer estudio .....	87
Figura 26. Representación gráfica de la concentración de PigMAP en el tercer estudio.....	88
Figura 27. Representación gráfica de la concentración de NA en el tercer estudio .....	88
Figura 28. Representación gráfica de los efectos significativos en la concentración de los NT y metabolitos monoaminérgicos en la PFC para el tercer estudio.....	90
Figura 29. Representación gráfica de los efectos significativos en la concentración de los NT y metabolitos monoaminérgicos en el hipocampo para el tercer estudio. ....	92
Figura 30. Resultados significativos c-Fos, ERK1/2 y CP en el hipocampo para el tercer estudio. ..	95
Figura 31. Representación gráfica de la concentración de BDNF en el hipocampo en el tercer estudio. ....	96
Figura 32. Gráfico de puntuaciones del análisis discriminante del tercer estudio.....	98
Figura 33. Cronograma del estudio del capítulo 4. ....	101
Figura 34. Representación gráfica de los niveles de colesterol, CK y Hp en suero en el pretratamiento y el postratamiento del cuarto estudio.....	103
Figura 35. Representación gráfica de los niveles de GPx, lactato y cortisol colesterol, CK y Hp en el cuarto estudio .....	104
Figura 36. Representación gráfica de los niveles de CK, lactato, GPx, Hp, SOD y colesterol en suero en el cuarto estudio.....	105
Figura 37. Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en la amígdala en el cuarto estudio. ....	109
Figura 38. Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en la PFC en el cuarto estudio. ....	109
Figura 39. Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en la el hipotálamo en el cuarto estudio.....	110
Figura 40. Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en el núcleo estriado en el cuarto estudio .....	110
Figura 41. Representación gráfica del análisis de términos Gene Ontology (GO) de las proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ.....	114
Figura 42. Representación gráfica de las interacciones entre las proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ en el cuarto estudio. ....	115
Figura 43. Representación gráfica de los cambios producidos en SNC por los distintos factores estudiados. ....	133
Figura 44. Representación gráfica de las correlaciones entre parámetros.....	135

**TABLAS**

Tabla 1. Parámetros bioquímicos determinados y el nombre del kit comercial utilizado para su cuantificación mediante el analizador automático AU400. ....	43
Tabla 2. Parámetros determinados mediante ELISAs y el nombre del kit comercial utilizado para su cuantificación. ....	43
Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados para la inmunodetección de las proteínas de interés. ...	44
Tabla 4. Condiciones utilizadas en la inmunodetección mediante <i>blot</i> de las diferentes moléculas.	50
Tabla 5. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el primer experimento. ....	60
Tabla 6. <i>P</i> valores de los efectos evaluados para los parámetros medidos en suero del primer experimento.....	61
Tabla 7. <i>P</i> valores de las comparaciones múltiples para los parámetros medidos en suero del primer experimento.....	63
Tabla 8. Concentración de los metabolitos de las vías de las catecolaminas e indolaminas en las 4 regiones de estudio.....	65
Tabla 9. Resultado del análisis de componentes principales (PCA) de las regiones del primer experimento.....	65
Tabla 10. Concentración de NT y sus metabolitos, y <i>P</i> valores en el primer experimento. ....	66
Tabla 11. Resumen del análisis factorial completo del primer experimento.....	68
Tabla 12. Resumen de las diferencias en los factores del PCA para el primer estudio.....	70
Tabla 13. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el segundo estudio.....	76
Tabla 14. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el segundo estudio.....	77
Tabla 15. Concentración de NT y sus metabolitos en la amígdala en el segundo estudio.....	78
Tabla 16. Concentración de NT y sus metabolitos en la PFC en el segundo estudio.....	79
Tabla 17. Concentración de NT y sus metabolitos en el hipocampo en el segundo estudio.....	79
Tabla 18. Concentración de NT y sus metabolitos en el hipotálamo en el segundo estudio.....	80
Tabla 19. Concentración de NT y sus metabolitos en la amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo tras un manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) y según la clasificación individual para el test TI (T <sub>neg</sub> o T <sub>pos</sub> ).....	81
Tabla 20. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el tercer estudio.....	87
Tabla 21. Concentración de los NT y sus metabolitos en la PFC en el tercer estudio.....	89
Tabla 22. Concentración de los NT y sus metabolitos en el hipocampo en el tercer estudio.....	91
Tabla 23. Niveles de expresión de los marcadores moleculares de estrés, c-Fos y ERK1/2 y del grado de carbonilación de proteínas (CP) en la PFC para el tercer estudio.....	93
Tabla 24. Niveles de expresión de los marcadores moleculares de estrés, c-Fos y ERK1/2 y del grado de carbonilación de proteínas (CP) en el hipocampo para el tercer estudio.....	94
Tabla 25. Concentración de BDNF en el hipocampo en el tercer estudio.....	96

Tabla 26. Estadísticos del análisis discriminante del tercer estudio.....	97
Tabla 27. Resultados de la clasificación de autoverificación del análisis discriminante del tercer estudio .....	97
Tabla 28. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el cuarto estudio.....	103
Tabla 29. <i>P</i> valores de la comparación por pares con ajuste Bonferroni para evaluar el efecto del tratamiento en el cuarto estudio.....	104
Tabla 30. Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el cuarto estudio.....	105
Tabla 31. Concentración de NA y A en el suero en el cuarto estudio.....	106
Tabla 32. Contenido de grupos carbonilos en las proteínas (CP) y de peroxidación lipídica (PL) en hipocampo y PFC para el cuarto estudio.....	106
Tabla 33. Correlación entre las variables relacionadas con el estrés oxidativo.....	107
Tabla 34. Concentración de los NT y sus metabolitos en las 5 regiones analizadas en el cuarto estudio. ....	107
Tabla 35. Niveles de expresión de c-Fos, ERK1/2 y BDNF en la PFC y el hipocampo para el cuarto estudio. ....	111
Tabla 36. Diseño experimental del iTRAQ.. ....	111
Tabla 37. Listado de proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ.....	112
Tabla 38. Coeficientes de correlación de los parámetros medidos en el estudio 3.....	163

# ABREVIATURAS

Tabla A. Listado de abreviaturas

Abreviaturas	Significado
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina, 5-hidroxitriptamina
A	Adrenalina
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa
ACTH	Corticotropina
APP	Proteínas de fase aguda
AU	Unidad de absorbancia
AVP	Arginina-vasopresina
BDNF	del inglés <i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BNST	Núcleos del lecho de la estría terminal (del inglés <i>bed nucleus of the stria terminalis</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino
CATtotal	Total Catecolaminérgico
CICUA	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales
CID	Disociación inducida por colisión
CK	Creatina quinasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CP	Carbonilación de proteínas
CRH	Factor liberador de corticotropina
CRP	Proteína C-reactiva
DA	Dopamina
DAtotal	Total Dopaminérgico
DHBA	3,4-dihidroxibenzilamina bromhidrato
DNP	2,4-dinitrofenilhidrazona
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EDTA	Etilendiaminatetraacetato
EE	Enriquecimiento ambiental
ERK	del inglés Extracellular signal-regulated kinases
ESI	Ionización por electrospray
FC	del inglés <i>Fold change</i>
FD	Función discriminante
FDR	del inglés <i>false discovery rate</i>
GC	Glucocorticoides
GLM	Modelo lineal general
GO	Términos <i>Gene Ontology</i>
GPx	Glutatión peroxidasa
HCD	Colisión de alta energía
Hp	Haptoglobina
HPA	Eje hipotálamo-pituitario-adrenal
HPLC	del inglés <i>high performance liquid chromatography</i>
HVA	Ácido homovanílico
IAA	Iodoacetamida
ID	Alojamiento interior
IDTL	Alojamiento interior y transporte largo



INDtotal	Total Indolaminas
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agrolimentaries
ITDTC	Alojamiento interior y transporte corto
iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta
LC	Locus cérico
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
MALDI	Desorción láser asistida por matriz
MAO	Monoamina oxidasa
MAPK	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MC	Mineralocorticoide
MDA	Malondialdehido
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
MS	Espectrometría de masas
NA	Noradrenalina
NN	Libres del gen halotano
Nn	Portadores del gen halotano
NT	Neurotransmisor/es
N $\omega$	Oxalato de N $\omega$ -metil-5-hidroxitriptamina
OD	Alojamiento exterior
ODTC	Alojamiento exterior y transporte corto
ODTL	Alojamiento exterior y transporte largo
PCA	Análisis de componentes principales
PFC	Corteza prefrontal
Pig-MAP	Pig-Major Acute Phase Protein
PL	Peroxidación lipídica
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Temperatura ambiente
SAM	Eje simpático-adrenomedular
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SE	Error estándar
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	octilsulfato de sodio
TB	Tratamiento empobrecido
TC	Transporte corto
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris (2-cloroetil)-fosfato
TE	Tratamiento enriquecido
TEAB	Trietilamonio bicarbonato
TI	Test de inmovilidad tónica
TIneg	Negativo para el TI
TIpos	Positivo para el TI
TL	Transporte largo
TOF	Tiempo de vuelo
VMA	Ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico
VTA	Área tegmental ventral

# RESÚMENES



## RESUMEN

Los sistemas de producción porcina modernos, encarados a la reducción de costes y aumento de productividad, han propiciado una pérdida de bienestar animal. Son conocidos los múltiples factores que pueden provocar estrés y/o pérdida de bienestar en la producción porcina, como la restricción alimentaria, condiciones ambientales adversas y el manejo. La legislación ha avanzado en los últimos años para establecer las condiciones de cría, alojamiento, transporte y sacrificio que garanticen un bienestar animal aceptable.

Las metodologías más usadas para medir el estrés y bienestar animal son observaciones conductuales y biomarcadores en suero que se ven alterados en la respuesta al estrés. Estas determinaciones tienen limitaciones, y no existe ningún criterio suficientemente objetivo ni específico para evaluar el estrés. Por otro lado, se desconoce hasta qué punto se ve alterado el patrón neuroquímico cerebral de respuesta al estrés. Conocer estas variaciones sería el paradigma que permitiría caracterizar esta respuesta.

Por ello, en este trabajo, aparte de evaluar los marcadores tradicionales en el suero bajo diferentes condiciones de alojamiento, estrés y/o características de los cerdos, se evalúan los neurotransmisores y otros parámetros en el sistema nervioso central (SNC). Las vías neuronales que controlan la respuesta al estrés, miedo, agresión, emoción, entre otras conductas, incumben regiones cerebrales específicas como la amígdala, el hipocampo o la corteza prefrontal, que procesan información de estímulos externos e internos, y organizan la respuesta autónoma mediante la regulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal.

Este trabajo consta de 4 capítulos en los que se analizan posibles factores estresantes: la susceptibilidad al estrés causada por el genotipo halotano, combinado con distinto sexo; el estrés por manejo, combinado con la respuesta al miedo; el estrés por transporte combinado con condiciones de alojamiento de interior/exterior y condiciones de alojamiento de interior/exterior y alojamiento en condiciones de enriquecimiento o empobrecimiento ambiental.

Las diferencias observadas en los marcadores séricos causadas por las condiciones de estudio son muy variables, pero algunas variaciones en sus niveles se pueden asociar a las distintas condiciones de cría, sacrificio y características de los animales.

Tradicionalmente el sistema noradrenérgico en el locus cerúleo ha sido relacionado con la respuesta al estrés, pero los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico también están consistentemente implicados. Leves alteraciones de la vía serotoninérgica se relacionan con el estrés por manejo y un fenotipo miedoso ante estímulos externos. Por otro lado, el estrés por transporte largo activa las vías dopaminérgica mesocorticolímbica y noradrenérgica hacia la corteza prefrontal. El análisis de otros marcadores moleculares de estrés, como el factor

neurotrófico BDNF, c-Fos y ERK1/2 también sugieren este efecto del estrés por transporte en los circuitos neuronales.

El alojamiento en el exterior no confiere grandes cambios en las vías de neurotransmisores estudiadas, pero sugiere distinta capacidad de hacer frente al estrés por transporte; y el empobrecimiento ambiental provoca la activación de las vías dopaminérgica y noradrenérgica en varias regiones corticolímbicas.

Mediante herramientas proteómicas se determinó la expresión diferencial de proteínas en hipocampo en enriquecimiento, que evidenció cambios en actividad neuronal. En sinergia con lo observado en los niveles de neurotransmisores, se sugiere un efecto directo de las condiciones de alojamiento sobre regiones del SNC involucradas en control de emociones y estrés.

Todo ello sugiere la especificidad de la respuesta al estrés, según la percepción del individuo, el tipo y la intensidad del estresor, y el efecto de las condiciones de alojamiento sobre el SNC, indicando la necesidad de continuar mejorando las condiciones de cría, manejo, transporte y sacrificio de los animales de producción para garantizar el mayor bienestar y el menor estrés posible. También, es necesario profundizar en el conocimiento de la evaluación laboratorial y el conocimiento molecular de estos procesos.

## RESUM

Els sistemes de producció porcina actuals estan encarats a la reducció de costos i l'augment de productivitat i han propiciat una pèrdua de benestar animal. Són coneguts els múltiples factors que poden provocar estrès i/o pèrdua de benestar en la producció porcina, com la restricció alimentària, condicions ambientals adverses i el maneig. La legislació ha avançat durant els últims anys per establir les condicions de cria, allotjament, transport i sacrifici que garanteixin un benestar animal acceptable.

Les metodologies més emprades per mesurar l'estrès i benestar animal són observacions conductuals i biomarcadors en sèrum que es veuen alterats en la resposta a l'estrès. Aquestes determinacions tenen limitacions, i no hi ha cap criteri prou objectiu ni específic per avaluar-lo. D'altra banda, es desconeix fins a quin punt es veu alterat el patró neuroquímic cerebral de resposta a l'estrès. Conèixer aquestes variacions seria el paradigma que permetria caracteritzar aquesta resposta.

Per això, en aquest treball, a part d'avaluar els marcadors tradicionals en el sèrum sota diferents condicions d'allotjament, estrès i/o característiques dels porcs, s'avaluen els neurotransmissors i altres paràmetres en el sistema nerviós central (SNC). Les vies neuronals que controlen la resposta a estrès, por, agressió, emoció, entre d'altres conductes, involucren regions cerebrals específiques com l'amígdala, l'hipocamp o l'escorça prefrontal, que processen informació d'estímuls externs i interns, i organitzen la resposta autònoma mitjançant la regulació de l'eix hipotàlem-pituitari-adrenal.

Aquest treball consta de 4 capítols en què s'analitzen possibles factors estressants: la susceptibilitat a l'estrès causada pel genotip halotà, combinat amb diferent sexe; l'estrès per maneig, combinat amb la resposta a la por; l'estrès per transport combinat amb condicions d'allotjament d'interior/exterior i condicions d'allotjament en condicions d'enriquiment o empobriment ambiental.

Les diferències observades en els marcadors sèrics causades per les condicions d'estudi són molt variables, però algunes variacions en els seus nivells es poden associar a les diferents condicions de cria, sacrifici i característiques dels animals.

Tradicionalment el sistema noradrenèrgic ha estat relacionat amb la resposta a l'estrès, però els sistemes dopaminèrgic i serotoninèrgic també estan consistentment implicats. Lleus alteracions de la via serotoninèrgica es relacionen amb l'estrès per maneig i un fenotip poruc davant estímuls externs. D'altra banda, l'estrès per transport llarg activa les vies dopaminèrgica mesocorticolímbica i noradrenèrgica cap a l'escorça prefrontal. L'anàlisi d'altres marcadors moleculars d'estrès, com el factor neurotròfic BDNF, c-Fos i ERK1/2 també suggereix aquest efecte de l'estrès per transport a les xarxes neuronals.

L'allotjament exterior no confereix grans canvis en les vies de neurotransmissors estudiades, però suggereix diferent capacitat de fer front a l'estrès per transport; i l'empobriment ambiental provoca l'activació de les vies dopaminèrgica i noradrenèrgica en diverses regions corticolímbiques. Mitjançant eines proteòmiques es va determinar l'expressió diferencial de proteïnes en hipocamp en condicions d'enriquiment ambiental, que va evidenciar canvis en l'activitat neuronal. En sinergia amb l'observat en els neurotransmissors, es suggereix un efecte directe de les condicions d'allotjament sobre regions del SNC involucrades en control d'emocions i estrès. Tot això suggereix l'especificitat de la resposta a l'estrès, segons la percepció de l'individu, el tipus i la intensitat de l'estressor, i l'efecte de les condicions d'allotjament sobre el SNC, indicant la necessitat de continuar millorant les condicions de cria, maneig, transport i sacrifici dels animals de producció per garantir el major benestar i el menor estrès possible. També, cal aprofundir en el coneixement de l'avaluació laboratorial i en el coneixement molecular d'aquests processos.

## SUMMARY

Modern pig husbandry, focused on reducing costs and increasing productivity, has led to a loss of animal welfare. There are multiple factors known to cause stress and/or loss of welfare in porcine production, such as food restriction, adverse environmental conditions and management. Legislation has advanced in recent years to establish breeding, housing, transport and slaughter conditions that guarantee acceptable animal welfare.

Classical methodologies for measuring stress and animal welfare are behavioral observations and serum biomarkers that are altered in the stress response. These techniques have limitations, and they are not objective and specific enough to assess stress. On the other hand, it is not known how the brain neurochemical pattern of response to stress is altered. Unravel these variations would be the paradigm for the characterization of this response.

Therefore, in this work, besides evaluating the traditional markers in the serum under different housing conditions, stress and/or pig characteristics, neurotransmitters and other parameters in the central nervous system (CNS) are evaluated. Neural pathways that control the response to stress, fear, aggression, emotion, and other behaviors include specific brain regions such as the amygdala, hippocampus or prefrontal cortex, which process information from external and internal stimuli, and organize the autonomous response by regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

This work consists of 4 chapters analyzing different possible stressors: susceptibility to stress caused by the halothane genotype, combined with different sex; management stress, combined with response to fear; transport stress combined with indoor/outdoor housing and enriched housing conditions.

Differences observed in serum biomarkers caused by these conditions are very variable, but some variations in their levels may be associated with the different conditions of breeding, slaughter and characteristics of the animals.

Traditionally the noradrenergic system has been related to the stress response, but the dopaminergic and serotonergic systems are also consistently involved. Mild alterations of the serotonergic pathway are related to management stress and a fearful phenotype to external stimuli. On the other hand, long transport stress activates the mesocorticolimbic and noradrenergic dopaminergic pathways towards the prefrontal cortex. Analysis of other molecular markers of stress, such as the neurotrophic factor BDNF, c-Fos and ERK1/2 also suggest this effect of transport stress on neural networks.

Outdoor housing does not confer great changes in the neurotransmitter pathways, but suggests a different capacity to cope with transport stress; and barren housing conditions causes the activation of the dopaminergic and noradrenergic pathways in several corticolimbic regions.



Proteomic tools were used to determine the differential expression of proteins in the hippocampus between two different housing conditions (enriched and barren), suggesting changes in neuronal activity. In synergy with what is observed at neurotransmitter levels, a direct effect of housing conditions on CNS regions involved in emotion and stress management is suggested.

All these results suggest the specificity of the stress response according to the individual trait, the type and the intensity of the stressor, and the effect of the housing conditions on the CNS, indicating the need to continue improving the conditions of breeding, transport and slaughter of farm animals to ensure the highest welfare and least stress. Also, it is necessary to improve the understanding of the laboratory evaluation and the molecular basis of these processes.

# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## 1. Estrés

El estrés se define como un estado de alteración del organismo para mantener su homeostasis. Walter Cannon definió a principios del siglo XX el término “homeostasis” para referirse al conjunto de mecanismos fisiológicos, como la regulación glucosa y el oxígeno en sangre y la temperatura, que permitían al organismo afrontar las perturbaciones procedentes de cambios en el ambiente. Describió que estos mecanismos provocaban la activación del sistema simpático-adrenomedular (SAM) y lo denominó la respuesta de “lucha-huida” (*fight or flight*) (Cannon, 1929).

Posteriormente, Hans Selye introdujo el término “estrés” como un concepto médico y científico, definiéndolo como “la respuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda”. Esta respuesta la describió como el “Síndrome General de Adaptación” que constaba de tres fases: la reacción de alarma, la fase de resistencia y la fase de agotamiento (Selye, 1936). También definió alguna de las respuestas fisiológicas, como la hipertrofia adrenal, la ulceración gástrica y la reducción del tamaño del timo. Hasta ese momento, solo se había relacionado con el mantenimiento de la homeostasis al sistema SAM, pero en 1950, Selye destacó la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) como efector clave de la respuesta a estrés (Selye, 1950).

Estas respuestas endocrinas al estrés conforman la respuesta no específica, ya que estímulos muy diversos las desencadenan. Paralelamente, las situaciones estresantes desencadenan una respuesta específica característica del estímulo al que el individuo es sometido. Los conceptos modernos de estrés lo definen como una amenaza para la homeostasis en la cual la respuesta tiene especificidad dependiendo del estímulo que lo provoca, la percepción del organismo de este y su capacidad de hacerle frente (Goldstein & Kopin, 2007).

## 2. Clasificación de los estímulos estresantes

La respuesta al estrés dependerá de la intensidad y la duración del estímulo causante de la disrupción de la homeostasis. Así pues existen respuestas muy reactivas a través de parámetros como la adrenalina (A) o la corticotropina (ACTH) de manera que ante perturbaciones mínimas se observan grandes cambios en sus niveles, y otras variables para las que se necesita cierta intensidad de estrés, como la glucosa y los glucocorticoides (GC) que suelen representar respuesta a estímulos de intensidad moderada.

En cuanto a la **duración**, los estresores se dividen en dos categorías:

- **Estrés agudo:** se produce una liberación de monoaminas y hormonas, que generan un procesamiento inicial de la información y una respuesta conductual. Estos procesos son

necesarios para redirigir el uso de energía entre órganos y tejidos para preparar al organismo para afrontar la situación amenazante (Pacák & Palkovits, 2001).

- **Estrés crónico:** causado por la exposición repetida o prolongada a un estresor que conlleva un constante vaivén entre homeostasis y estrés. Genera cambios en morfología dendrítica, neurogénesis y respuesta funcional, y en la activación del eje HPA (*ver apartado 4.1*) que puede desencadenar dos respuestas, de habituación o de facilitación. La habituación ocurre cuando el mismo estímulo repetido habitualmente provoca una menor respuesta y la facilitación es el aumento de respuesta ante un evento estresante novedoso. Estos hechos son debidos a que en una situación de estrés crónico se mantiene una concentración basal de GC mayor, que satura los receptores con mayor facilidad y a su vez regula a la baja los receptores de GC (Herman, Ostrander, Mueller, & Figueiredo, 2005). Además, el estrés crónico también puede debilitar las estructuras que regulan negativamente la respuesta a estrés y fortalecer aquellas que la promueven (Arnsten, 2009).

En cuanto al **tipo** de estímulo estresante, se pueden clasificar en 4 categorías (Pacák & Palkovits, 2001):

- Estresores **físicos:** pueden tener también componente psicológico, por ejemplo, calor, frío, radiación, ruido, etc.
- Estresores que afectan la homeostasis **cardiovascular** y **metabólica**, como el ejercicio, la exposición a calor, la hipoglucemia, hemorragia, etc.
- Estresores **psicológicos:** afectan procesos emocionales y puede resultar en cambios en el comportamiento, por ejemplo ansiedad, miedo o frustración.
- Estresores **sociales:** interacciones dificultosas con otros individuos.

Estas 4 categorías se resumen en estímulos de dos **naturalezas**, fisiológicos y emocionales (Herman et al., 2016; Herman & Cullinan, 1997).

- Los **estímulos fisiológicos** representan una amenaza real para el organismo y por lo tanto provocan una activación más rápida y directa del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) provocando una respuesta reactiva.
- Los **estímulos emocionales** pueden ser estímulos condicionantes o de memoria o predisposiciones innatas o especie-específicas. Estos provocan una respuesta anticipatoria al estrés a través de estructuras relacionadas con el control de las emociones, como el hipocampo, la amígdala o la corteza prefrontal (PFC) que a través de núcleos intermedios actúan sobre el PVN.

Aun así, estas dos reacciones y estímulos se superponen, ya que un entorno asociado a un estresor sensorial puede convertirse en una respuesta de anticipación al estrés (Herman et al., 2003).

Además, cabe destacar que diferentes factores pueden producir respuestas similares a estrés, y a su vez, el mismo estímulo estresante puede producir distinta respuesta dependiendo de la genética del animal, del sistema de producción o de experiencias previas (Martínez-Miró et al., 2016).

## 2.1. Estímulos emocionales

Clásicamente, las emociones han sido definidas como estímulos subjetivos y el estado fisiológico asociado a ellas, como el incremento o reducción en la frecuencia cardíaca, flujo sanguíneo cutáneo, piloerección, sudoración o motilidad gastrointestinal (Purves et al., 2004). Estas suceden a partir de cambios fisiológicos, cognitivos y de conducta para constituir una respuesta de supervivencia. Se clasifican en negativas, como el miedo o el dolor, y las positivas como la saciedad, la seguridad, el confort o las oportunidades reproductivas.

Aun así, la definición del concepto “emoción” genera discrepancia ya que se ha usado y estudiado desde diferentes puntos de vista. Algunos investigadores han definido las emociones como estados obtenidos por recompensa o castigo, mientras que otros se han centrado en el papel de las emociones en la evaluación consciente o inconsciente de distintos eventos (Pessoa, 2017).

En los años 1920 y 1930, Bard señaló al hipotálamo como centro crítico para la coordinación del comportamiento emocional (Bard, 1934). Pocos años después, Papez propuso una distribución del mecanismo responsable para la emoción que incluía otras regiones a parte del hipotálamo, como el hipocampo, el tálamo o el giro cingulado (Papez, 1937). Esta teoría de circuito neuronal de control de las emociones se refinó más tarde por MacLean hacia el concepto de sistema límbico, descrito tiempo atrás por Broca, incluyendo más áreas cerebrales, especialmente, la amígdala (MacLean, 1949). Aunque el concepto de sistema límbico continúa hoy en día siendo la teoría predominante sobre como el sistema nervioso central (SNC) maneja las emociones, existe gran debate y discusión en torno a este término y qué áreas cerebrales forman parte de dicho sistema (Ledoux, 2000).

Para comprender mejor los circuitos específicos y las regiones involucrados en el control y respuesta a las emociones, se han desarrollado varios modelos animales de comportamiento emocional. El más destacado es el del miedo condicionado en ratas, inicialmente estudiado por Pavlov (Pavlov, 1927). En estos experimentos, un estímulo inicialmente neutro (por ejemplo, un sonido) es apareado repetidas veces con uno repulsivo (por ejemplo, un choque eléctrico). Con el tiempo, el animal comienza a responder al estímulo neutro con comportamientos similares a los producidos por el estímulo amenazante. Estas respuestas incluyen mecanismos de comportamiento defensivo (*freezing*), autónomos (presión sanguínea), y endocrinos (liberación de hormonas) (Ledoux, 2000).

El **miedo** y la **ansiedad** son respuestas defensivas y adaptativas a amenazas, y aunque comparten muchos síntomas y respuestas con el estrés, difieren en algunos aspectos (Rosen & Schulkin, 1998).

El **miedo** es provocado por una amenaza clara, real y presente, tiene carácter adaptativo, provoca respuestas defensivas y finaliza al desaparecer el estímulo. La conducta de miedo puede ser dividida en miedo innato, aquel que se posee desde el nacimiento como una reacción especie-específica y el condicionado que es el resultado de aprender a relacionar un estímulo con miedo o dolor (Blanchard & Blanchard, 2008). La **ansiedad**, en cambio, está relacionada con emociones subjetivas, aparece ante estímulos más difusos o menos predecibles y deriva de la anticipación ante la posible aparición de una situación amenazante. Todo ello conlleva a una respuesta maladaptativa por la falta de concreción del estímulo que la provoca y el tiempo de duración. Este estado de anticipación al peligro provoca un estado de alerta y una preparación fisiológica para una respuesta rápida, como sucede con el miedo (Lang, Davis, & Ohman, 2000).

### 3. Integración de estímulos en el SNC

Los estímulos estresantes, tanto sean de origen fisiológico como emocional o psicológico, desencadenan la respuesta al estrés. Esta respuesta es generada cuando el SNC percibe una amenaza, hecho que depende de factores intrínsecos al estímulo estresante (como duración e intensidad) y factores intrínsecos al individuo (edad, sexo, recuerdos o eventos previos).

Se han descrito muchas similitudes en los circuitos neuronales que median las respuestas a estímulos, siendo las estructuras principales involucradas en el procesamiento la amígdala, el hipocampo y la PFC.

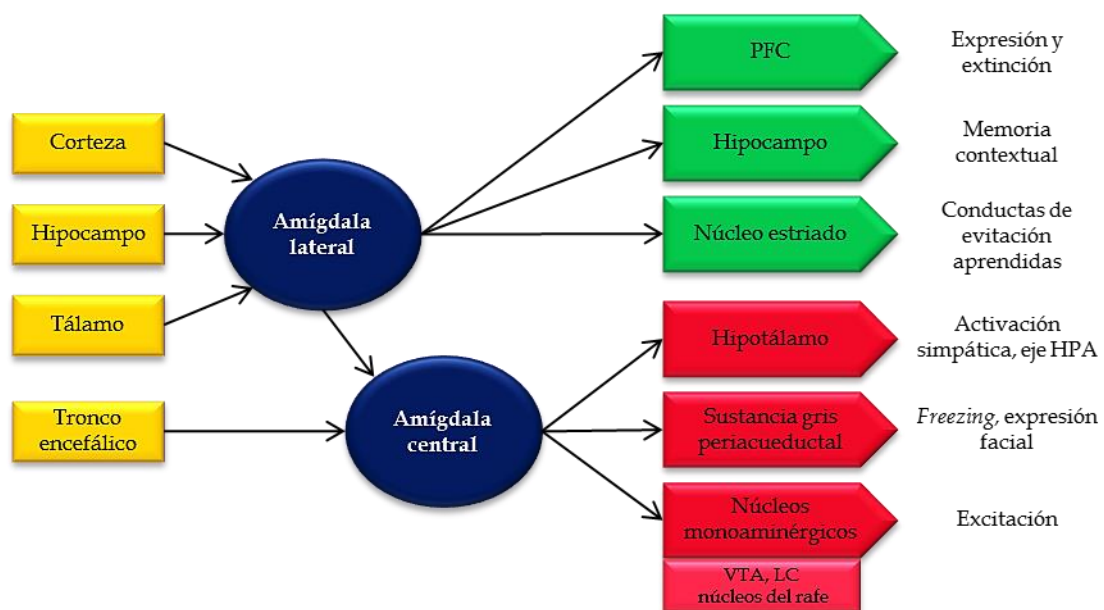
La respuesta e integración neuronal al miedo está ampliamente estudiada, sobre todo en el caso del miedo condicionado, y está centrada en la actividad de la amígdala, como se ha descrito anteriormente. En cambio, los circuitos neuronales que se activan ante estímulos ansiogénicos han creado más discrepancia. Pese a que las regiones involucradas, así como la respuesta del organismo, son mayoritariamente las mismas ante los distintos tipos de estímulos, la ansiedad se supone mediada por los núcleos del lecho de la estría terminal (BNST, del inglés *bed nucleus of the stria terminalis*) en vez de por la amígdala (Tovote, Fadok, & Lüthi, 2015). En la Figura 1 se muestra el esquema de los circuitos neuronales implicados en la integración de estímulos.

La **amígdala** es una estructura clave en el control de la respuesta estímulos, entre los que destacan el miedo y el estrés (Chrousos, 2009; Tovote et al., 2015). Es una región anatómicamente compleja ya que contiene más de 12 núcleos interconectados. Se consideran dos grandes subunidades, la amígdala lateral y la central.

La amígdala lateral recibe información sensorial de la corteza y del tálamo (estímulos auditivos, visuales y somatosensoriales) e información referente al contexto del hipocampo (Ledoux, 2000). Posteriormente a la recepción de los estímulos, conecta con la PFC, el hipocampo y el núcleo estriado para producir la integración de los estímulos emocionales (Chrousos, 2009). Destacan la

función de la PFC en la expresión y extinción del miedo: la corteza infralímbica inhibe la actividad de la amígdala mediante neuronas inhibitorias, y la corteza prelímbica se encarga de dirigir la expresión del miedo condicionado (Maren & Holmes, 2016); el hipocampo en la regulación de la memoria contextual de asociación de un estímulo a una situación amenazante y la extinción de la respuesta; y el núcleo estriado se encarga del aprendizaje de evitación de dichas situaciones.

Por otro lado, la amígdala central recibe información sensorial relativa a estímulos repulsivos (ej: shock eléctrico en el miedo condicionado) proveniente de estructuras como el tronco encefálico (Ledoux, 2000). Su activación desencadena respuestas autónomas, neuroendocrinas y de comportamiento mediadas por conexiones con otras regiones (Nestler, Hyman, & Malenka, 2009). La conexión con el hipotálamo provoca la activación simpática y del eje HPA para la liberación de hormonas (respuesta al estrés); con la sustancia gris periacueductal que a su vez proyecta a regiones como el tronco del encéfalo para producir, entre otras, la respuesta de *freezing*; y con núcleos cerebrales de sistemas de neurotransmisores (NT), como por ejemplo el sistema dopaminérgico del área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra, el noradrenérgico del locus ceruleo (LC) y el serotoninérgico del núcleo del rafe (Chrousos, 2009; Pessoa, 2017).



**Figura 1.** Esquema de la relación entre las estructuras cerebrales implicadas en la regulación y respuesta a estímulos. Adaptado de Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

También cabe destacar que el estrés produce deficiencias en la extinción de la respuesta al miedo, que afectan tanto a la amígdala como al hipocampo y a la PFC, produciendo cambios en densidad dendrítica, actividad neuronal, densidad de receptores de diferentes NT o cambios en la excitabilidad sináptica (Maren, 2016).



## 4. Respuesta endocrina al estrés

La recepción de un estímulo amenazante provoca la activación de regiones del hipotálamo que desencadenan la respuesta del eje SAM. La activación de este eje conlleva a la producción de las catecolaminas noradrenalina (NA) y A. La NA es sintetizada mayoritariamente en las neuronas noradrenérgicas del LC y de los nervios postganglionares del sistema nervioso simpático. La A, y también parte de la NA, se producen en la médula de la glándula suprarrenal, desde donde se liberarán al torrente sanguíneo y accederán a los tejidos diana. La secreción de catecolaminas prepara al organismo para la respuesta “lucha-huida”, produciendo incremento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción y movilización de la reserva energética (Jansen, Nguyen, Karpitskiy, Mettenleiter, & Loewy, 1995).

Por otro lado, el principal efector de la respuesta endocrina a estrés es el eje HPA, que conllevará a la producción de GC, de acuerdo con el “Síndrome General de Adaptación” descrito por Selye (Selye, 1998).

### 4.1. Eje HPA

Independientemente del estímulo estresante y su procesamiento en el SNC, la integración de la respuesta al estrés se realiza en el PVN. En la Figura 2 se representa el esquema de la respuesta del eje HPA al estrés. Las neuronas del PVN sintetizan y secretan el factor liberador de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) entre otros. Estos factores llegan a la hipófisis anterior, también conocida como glándula pituitaria, donde inducen la síntesis de ACTH y su liberación al torrente sanguíneo, desde donde actuará en la glándula suprarrenal, promoviendo la liberación de GC y mineralocorticoides (MC) por parte de la corteza adrenal (Herman et al., 2005). Los GC regulan los cambios fisiológicos producidos a causa del estrés, como la movilización energética, la supresión del sistema inmune, la inhibición del crecimiento muscular y óseo, la potenciación de la vasoconstricción mediante el sistema nervioso simpático o la degradación de proteínas y lípidos, con la finalidad de restaurar la homeostasis del organismo (Munckt, Guyre, & Holbrooke, 1984).

#### 4.1.1. Regulación endocrina del eje HPA

Los GC también actúan modulando el eje HPA a través de dos mecanismos de retroinhibición negativa, que conducirán a una disminución de la secreción de CRH y ACTH. El mecanismo de acción clásico de los GC afecta a la transcripción génica y está mediado por los receptores intracelulares tipo I o mineralocorticoide y tipo II o glucocorticoide. Los GC tienen mayor afinidad por los receptores tipo I por lo que se sugiere que estos receptores actuarían regulando la actividad basal del HPA y los de tipo II en condiciones de estrés cuando los niveles de GC son más elevados puesto que son de menor afinidad. También existen diferencias en la localización de estos receptores. Mientras que los de tipo II están ampliamente distribuidos por todo el SNC, y

especialmente en las zonas claves para la regulación negativa del eje HPA (hipotálamo e hipófisis), la expresión de los de tipo I es más restringida a ciertas áreas cerebrales (Herman et al., 2005). También se han descrito receptores de membrana para los GC que afectarían cascadas de transducción de señal mediante mecanismos de señalización de respuesta rápida (Rainville, Pollard, & Vasudevan, 2015)

#### 4.1.2. Regulación neuronal del eje HPA

El PVN del hipotálamo recibe innervación sináptica de varias estructuras del SNC. Existe una modulación directa, a través de estructuras como otras regiones del hipotálamo, el tálamo o los núcleos del rafe, que a través de proyecciones serotoninérgicas estimula la secreción de ACTH y GC.

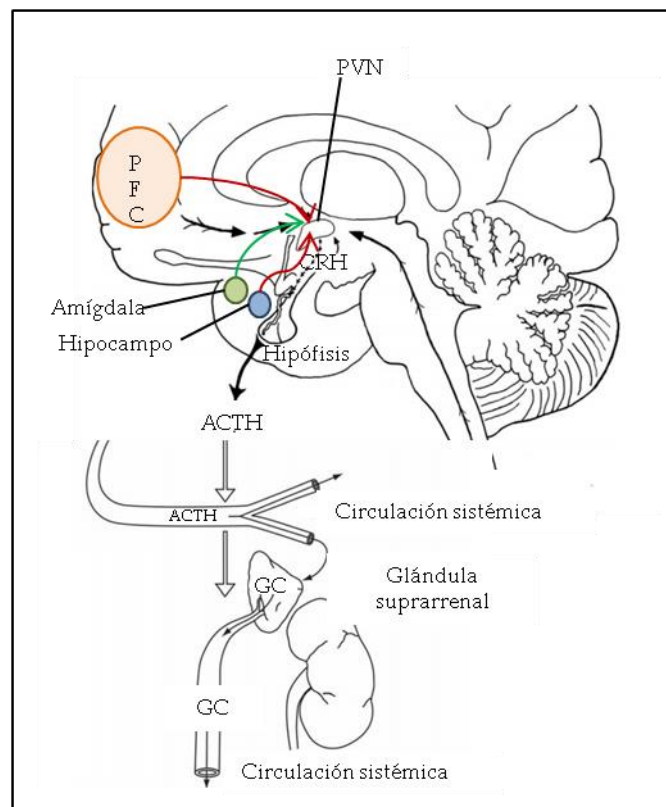
Además existe una regulación indirecta a través de otras estructuras, mostrada también en la Figura 2, que necesitan neuronas intermediarias para interactuar con el PVN. Son mayoritariamente regiones involucradas en las respuestas emocionales y de memoria, por lo tanto relacionadas con la respuesta a estrés anticipatoria, que requiere de experiencias previas. En todos los casos, la regulación por parte de estas regiones del eje HPA es específica de las subregiones y del tipo de estrés (Herman et al., 2003).

La estimulación de las neuronas del **hipocampo** reduce la actividad en el PVN e inhibe la secreción de GC ayudando a la finalización de la respuesta al estrés del eje HPA (Jacobson & Sapolsky, 1991). Paralelamente, lesiones en el hipocampo elevan los niveles basales de GC en circulación y prolongan la liberación de ACTH y GC en respuesta al estrés (Sapolsky, Krey, & McEwen, 1984). Se sugiere que esta retroinhibición del eje HPA es llevada a cabo mediante proyecciones a neuronas GABAérgicas que transmiten información inhibitoria a la región parvocelular del PVN mediada por los receptores de GC presentes en el hipocampo (Smith & Vale, 2006). Estos receptores tienen importancia en otras acciones fisiológicas, como en la consolidación de la memoria, con una relación de U invertida, indicando que niveles bajos o altos de GC implican disfunciones en la consolidación de la memoria (Diamond, Bennett, Fleshner, & Rose, 1992). También se ven involucrados sistemas de NT, como el colinérgico que juega un papel importante en la inhibición del eje HPA en la respuesta a estrés (Han, Bizon, Chun, Maus, & Gallagher, 2002).

La **PFC** también contiene gran número de receptores de GC, indicando su importancia en la retroinhibición por GC del eje HPA, que provoca la disminución de liberación de ACTH y por lo tanto de GC (Herman et al., 2005). Esta regulación sugiere una organización topográfica compleja. Mientras que la corteza infralímbica proyecta a regiones que se activan en la respuesta a estrés como la amígdala; la corteza prelímbica proyecta a regiones del hipotálamo y a la región peri-PVN

implicadas en la inhibición del estrés. Entre estas regiones de interés, se encuentran las regiones GABAérgicas del PVN (Herman et al., 2016; Hurley, Herbert, Moga, & Saper, 1991). La activación de la PFC también sucede mediante proyecciones noradrenérgicas provenientes del LC y proyecciones dopaminérgicas del VTA regiones involucradas en la integración de la respuesta a estrés por el eje HPA, o proyecciones del hipocampo, sugiriendo la sinergia para modular la regulación *downstream* de la respuesta a estrés (Herman et al., 2003; Ziegler, Cass, & Herman, 1999).

Al contrario que el hipocampo y la PFC, la **amígdala** actúa activando el eje HPA y por lo tanto, promueve la síntesis y liberación de CRH y GC al torrente sanguíneo, potenciando la respuesta al estrés a nivel sistémico (Dallman et al., 2003). La amígdala media se activa principalmente frente a estresores emocionales (respuesta anticipatoria) y la central lo hace ante estresores fisiológicos (respuesta reactiva) (Herman et al., 2003). Esta región también expresa receptores de GC indicando su capacidad de procesar cambios relativos a los niveles basales o de estrés de GC (Smith & Vale, 2006). A su vez las proyecciones aferentes de la amígdala a otras regiones cerebrales, sobre todo corticales, regulan la respuesta adaptativa al estrés (Dunn & Whitener, 1986; Herman et al., 2003).



**Figura 2.** Representación de la respuesta al estrés del eje HPA. Activación del PVN, secreción de CRH en la hipófisis, liberación de ACTH al torrente circulatorio, liberación de GC glándula suprarrenal. Flechas rojas: retroinhibición (PFC e hipocampo), flechas verdes: activación (amígdala). (Adaptado de Herman et al. 2003).

## 5. Monoaminas transmisoras

Los NT regulan determinadas funciones cerebrales. Pueden actuar localmente o como intermediarios entre regiones, siendo sintetizados por un número limitado de regiones y proyectando alrededor del SNC. De esta manera se generan las respuestas a diferentes estímulos, como el miedo, el estrés o la recompensa.

Las aminas biógenas están incluidas dentro de este grupo de NT con amplia proyección en el SNC e incluyen las catecolaminas, las indolaminas y la histamina (Nestler et al., 2009).

### 5.1. Catecolaminas

#### 5.1.1. Biosíntesis y degradación

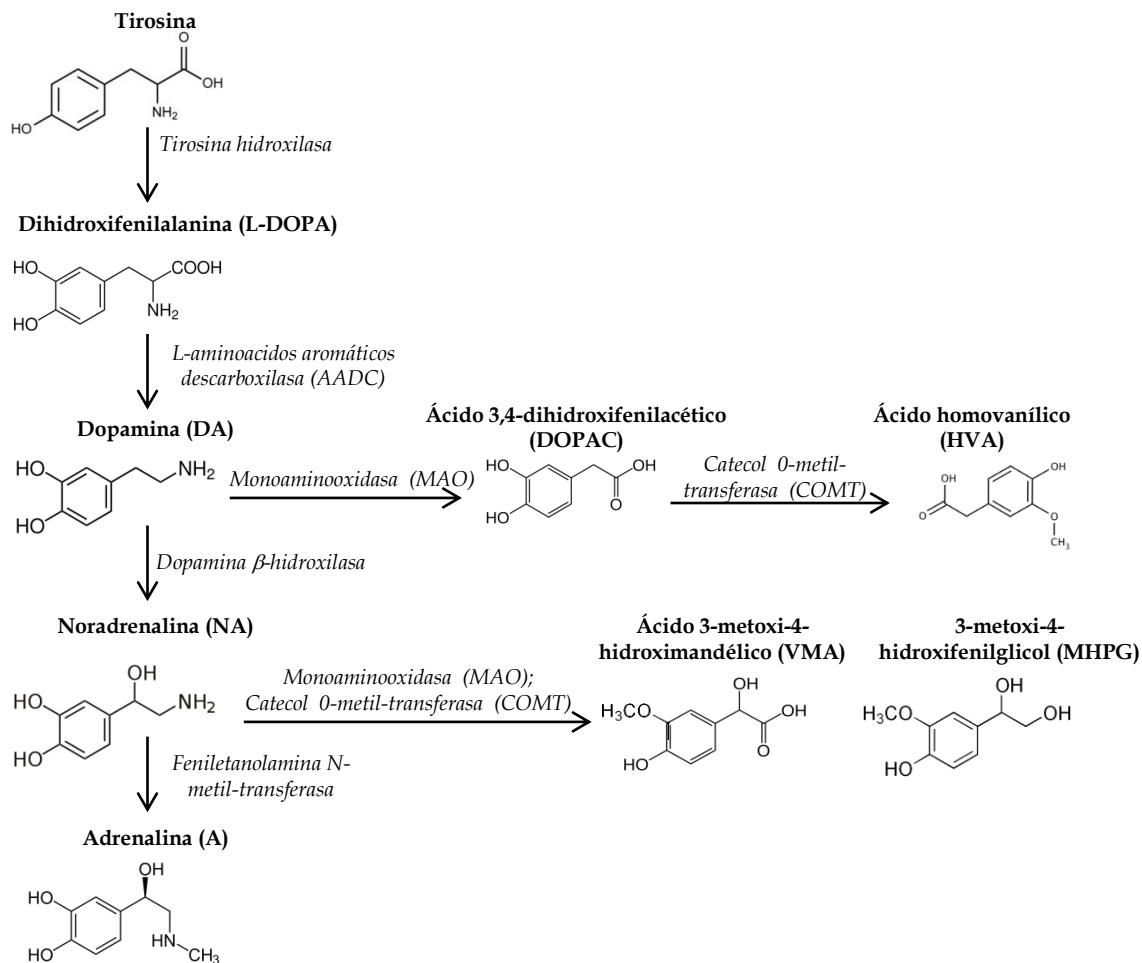
Dentro de este grupo se incluyen la dopamina (DA), la NA y la A. Son productos secuenciales de la misma vía biosintética, siendo sintetizadas a partir del aminoácido tirosina (Figura 3). La primera enzima de la vía de síntesis es la tirosina hidroxilasa que convierte la tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Es la enzima limitante de la síntesis de DA y NA y está presente en todas las células productoras de catecolaminas. Seguidamente, la L-DOPA es descarboxilada por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) para producir DA que será almacenada en las vesículas sinápticas. En las neuronas noradrenérgicas, la DA será convertida a NA por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en el interior de estas vesículas.

La A se sintetiza a partir de la NA en la glándula suprarrenal por la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa.

La expresión de estas enzimas está regulada de manera que las neuronas que producen NA no expresan la feniletanolamina-N-metiltransferasa y las que liberan DA no expresan la feniletanolamina-N-metiltransferasa ni la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa.

El mecanismo más frecuente por el cual finaliza la acción sináptica de las catecolaminas es por recaptación mediante transportadores específicos en las neuronas presinápticas y/o degradación enzimática (Kvetnansky, Sabban, & Palkovits, 2009).

Las catecolaminas son degradadas enzimáticamente mediante deaminación oxidativa por la monoamina oxidasa (MAO) y por 3-O-metilación por la catecol-O-metiltransferasa (COMT), generando varios metabolitos entre los que destacan el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el ácido homovanílico (HVA), el ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA) y el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG).



**Figura 3.** Vía biosintética de las catecolaminas. Los NT principales de la cual son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A). Adaptado Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

## 5.1.2. Tipos de receptores

### *Dopaminérgicos*

Existen 5 tipos de receptores de DA clasificados en 2 familias, los de tipo D1 y los de tipo D2.

La subfamilia de tipo D1 incluye los receptores D1 y D5. Estos están acoplados a proteínas  $G_{s/o}$  que estimulan la adenil ciclasa y se encuentran únicamente en neuronas postsinápticas. El receptor D1 se encuentran principalmente en el núcleo estriado y núcleo accumbens, y también en la amígdala, el hipotálamo y el tálamo. El receptor D5 se expresa a nivel más bajo que el D1 y está restringido al hipocampo y a núcleos del tálamo (Mansour & Watson, 1988; Smeets & Gonzalez, 2000).

La subfamilia de tipo D2 incluye los receptores D2, D3 y D4 y están acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  por lo que inhiben la actividad de la adenil ciclasa. El receptor D2 se encuentra mayormente en el núcleo estriado y el núcleo accumbens, pero también en la sustancia negra y en el VTA. Los D3 están distribuidos específicamente en el hipotálamo, en el cerebelo y en neuronas presinápticas de la sustancia negra. El receptor D4 muestra gran expresión en la corteza frontal, la amígdala, el

hipocampo y el hipotálamo (Jaber, Robinson, Missale, & Caron, 1996; Mansour & Watson, 1988; Vallone, Picetti, & Borrelli, 2000).

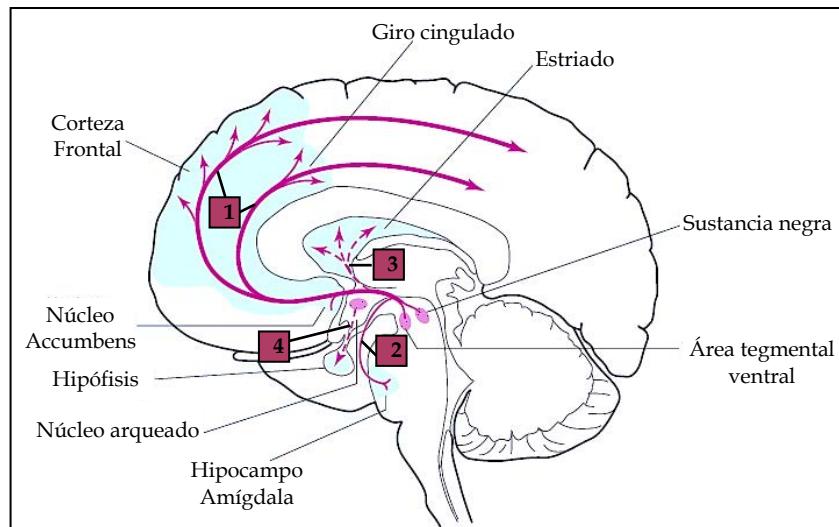
### *Adrenérgicos*

Como la DA, la NA también realiza su función a través de receptores acoplados a proteínas G. Se describen 9 receptores adrenérgicos clasificados en tres familias:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ . Los  $\alpha 1$  están acoplados a proteínas  $G_{q/11}$  por lo que activan la fosfolipasa responsable de la liberación de DAG e IP3, y se encuentran principalmente en la corteza cerebral, el núcleo estriado y el hipocampo. Los  $\alpha 2$  tienen funciones similares a los D2, están acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  por lo que inhiben la adenil ciclasa y su localización es más amplia que los  $\alpha 1$ , puesto que se encuentran en gran número de regiones entre las que destacan la corteza cerebral, el hipocampo, los ganglios basales, la amígdala, el LC y la medula espinal. Por último los  $\beta$  están acoplados a proteínas  $G_{s/o}$  que activan la adenil ciclasa, y se localizan en la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. En similitud a los D1, activan la actividad de la adenil ciclasa incrementando los niveles de cAMP y activando vías de señalización por fosforilación (Delaville, De Deurwaerdère, & Benazzouz, 2011; Flugge, 2000; Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2013; Smeets & Gonzalez, 2000).

### 5.1.3. Sistema dopaminérgico

El grupo más amplio de neuronas dopaminérgicas del SNC se encuentra en el mesencéfalo, incluyendo la sustancia negra y el VTA. Estas neuronas envían un gran número de señales ascendentes a la corteza cerebral y los ganglios basales. Por otro lado, las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo participan en la regulación autónoma y endocrina. Existen ocho vías dopaminérgicas (Björklund & Dunnett, 2007; Schott & Duzel, 2008; Smeets & Gonzalez, 2000; Vallone et al., 2000), las 4 más importantes, representadas en la Figura 4, son:

- **Vía mesocorticolímbica (vía mesocortical**, etiquetada con el número 1 en la Figura X, y **vía mesolímbica**, etiquetada con el número 2 en la Figura 4): proyectan del área VTA a la corteza frontal y temporal y a estructuras límbicas de la base del prosencéfalo (PFC, amígdala, hipocampo, núcleo accumbens, etc.). Están implicadas en emoción, motivación, almacenamiento de la memoria, atención y conductas de recompensa.
- **Vía negroestriada**, etiquetada con el número 3 en la figura 4: transmite de la sustancia negra al núcleo estriado y está relacionada con el aprendizaje y la función motora.
- **Vía tuberoinfundibular**, etiquetada con el número 4 en la figura X: transmite del núcleo arqueado del hipotálamo a la hipófisis y médula espinal provocando la secreción de hormonas.



**Figura 4.** Proyecciones dopaminérgicas en el cerebro. Etiquetas: 1 = vía mesocortical, 2 = vía mesolímbica, 3 = vía negroestriada, 4 = vía tuberoinfundibular. Adaptado de Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

### ***Vías dopaminérgicas, estrés y emociones.***

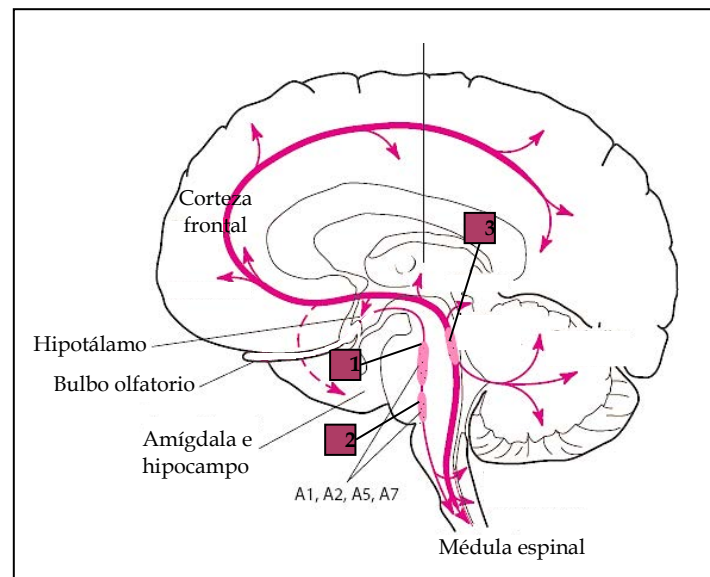
La actividad dopaminérgica está ligada con la formación, retención y extinción de la respuesta al miedo, la depresión, el abuso de drogas, la esquizofrenia y el Parkinson, entre otros (Millan, 2003).

Una actividad dopaminérgica óptima en las vía mesocorticolímbica es un requisito imprescindible para la respuesta al estrés y al miedo (Pani, Porcella, & Gessa, 2000; Seamans & Yang, 2004). La DA tiene un efecto de “U” invertida, ya que niveles demasiado bajos o demasiados altos provocan alteraciones en el funcionamiento correcto de las estructuras cerebrales (Arnsten, 2009), por lo que incrementos o disminuciones en la actividad de estas vías están relacionados con trastornos de ansiedad o estrés (Belujon & Grace, 2015; Millan, 2003; Tanaka, Yoshida, Emoto, & Ishii, 2000). Mientras que estresores agudos provocan un incremento de liberación de DA en la corteza frontal y el hipocampo, sugiriendo una respuesta activa para hacer frente al estrés, estos valores vuelven a niveles basales cuando el estresor es aplicado crónicamente y no se puede hacer frente a la situación (Arnsten, 2009; Pani et al., 2000; Segovia, Arco, & Mora, 2009).

Además, la activación de las proyecciones dopaminérgicas mesolímbicas, como proyecciones al núcleo accumbens del cuerpo estriado, está involucrada en motivación y recompensa, mientras que su disminución conlleva a anhedonia y depresión (Joca, Ferreira, & Guimarães, 2007a), de manera que emociones positivas que conllevan a la activación de esta vía podrían compensar los efectos negativos del estrés (Millan, 2003).

### **5.1.4. Sistema noradrenérgico**

El cuerpo celular de las neuronas productoras de NA se encuentra en el tronco encefálico. Una subpoblación de neuronas noradrenérgicas proyectan al hipotálamo (etiqueta 1 de la Figura 5) controlando funciones cardiovasculares y endocrinas. Otro de los subgrupos proyecta a la médula espinal (etiqueta 2 de la Figura 5) regulando reflejos autónomos y la sensibilidad dolorosa. Y finalmente, una tercera población localizada en el LC, que representa el 50% del total de las neuronas noradrenérgicas del SNC, proyecta difusamente por toda la corteza cerebral, el cerebelo y la médula espinal (etiqueta 3 de la Figura 5) manteniendo el estado de vigilia y la capacidad de respuesta a estímulos ambientales inesperados. De esta manera, el LC influye tanto en la activación a nivel del prosencéfalo como en la percepción sensitiva y el tono motor (Berridge & Waterhouse, 2003; Douglas, 2005).



**Figura 5.** Proyecciones noradrenérgicas en el cerebro. Etiquetas: **1** = proyección del tronco encefálico al hipotálamo, **2** = del tronco encefálico a la médula espinal, **3** = del LC a múltiples regiones del SNC. Adaptado de Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

### *Vías noradrenérgicas, estrés y emociones.*

Las neuronas noradrenérgicas están involucradas directamente en el procesamiento central de la respuesta a estrés. Las proyecciones noradrenérgicas desde el tronco encefálico se ven alteradas ante estímulos estresantes, pero el mayor cambio se observa en el LC. Numerosos tipos de estrés provocan la activación de las neuronas noradrenérgicas del LC que realiza proyecciones ascendentes entre las que destacan la corteza, el hipocampo, la amígdala y el núcleo estriado (Millan, 2003; Morilak et al., 2005; Stanford, 1995). La liberación de NA en estas regiones por estímulos estresantes es acompañada de manifestaciones emocionales, cognitivas y autonómicas de miedo (Joca et al., 2007a; Millan, 2003).



El estrés agudo lleva a alteraciones transitorias en el sistema noradrenérgico acompañado de la activación del eje HPA. Tras cierto período de tiempo que dependerá del carácter y la intensidad del estímulo estresante, la homeostasis será restaurada y volverán a niveles basales. El estrés crónico o repetido, puede inducir cambios permanentes en los niveles de la vía noradrenérgica induciendo un estado altamente activo. Además, este estado estresante prolongado puede agotar el almacén de NA, debido a no poder compensar el *turnover*, o a que la actividad de las neuronas noradrenérgicas se vea reducida, lo que conducirá a un déficit de NA en los terminales nerviosos (Carrasco & Van de Kar, 2003; Kvetnansky et al., 2009). Cabe destacar que, como la DA, la NA tiene un efecto de “U” invertida, por lo que niveles demasiado bajos o demasiados altos provocan alteraciones en el funcionamiento correcto de las estructuras cerebrales (Arnsten, 2009).

El LC también realiza proyecciones descendentes a la medula espinal, por los que las catecolaminas liberadas pasan a la circulación, pudiendo encontrarse en plasma (Tanaka et al., 2000). En condiciones de reposo, cantidades bajas de catecolaminas son liberadas al torrente sanguíneo por la medula adrenal, principalmente la A, y los terminales nerviosos simpáticos, principalmente la NA. Ante situaciones estresantes, cantidades mayores de A y NA son liberadas a la circulación. Estos cambios se han descrito ante numerosos tipos de estrés, con diferente intensidad (Kvetnansky et al., 2009).

## **5.2. Serotonina**

### **5.2.1. Biosíntesis y degradación**

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) pertenece al grupo de compuestos aromáticos llamados indoles y se sintetiza a partir del aminoácido triptófano (Figura 6). La primera enzima y a su vez la que controla la vía es la triptófano hidroxilasa, que dará lugar a 5-hidroxitriptófano a partir de triptófano. La segunda enzima es la AADC que descarboxila el compuesto anterior para dar lugar a la 5-HT. También es sintetizada en esta misma vía la melatonina, una neurohormona cuya actividad se ejerce fuera del SNC (Kandel et al., 2013; Nestler et al., 2009).

Igual que sucede con las catecolaminas, el mecanismo más frecuente por el cual finaliza la acción sináptica de la 5-HT es por recaptación mediante transportadores específicos en las neuronas presinápticas y/o degradación enzimática. La 5-HT es catabolizada por la MAO, siendo la isoforma MAO-B la que tiene mayor afinidad por esta indolamina.

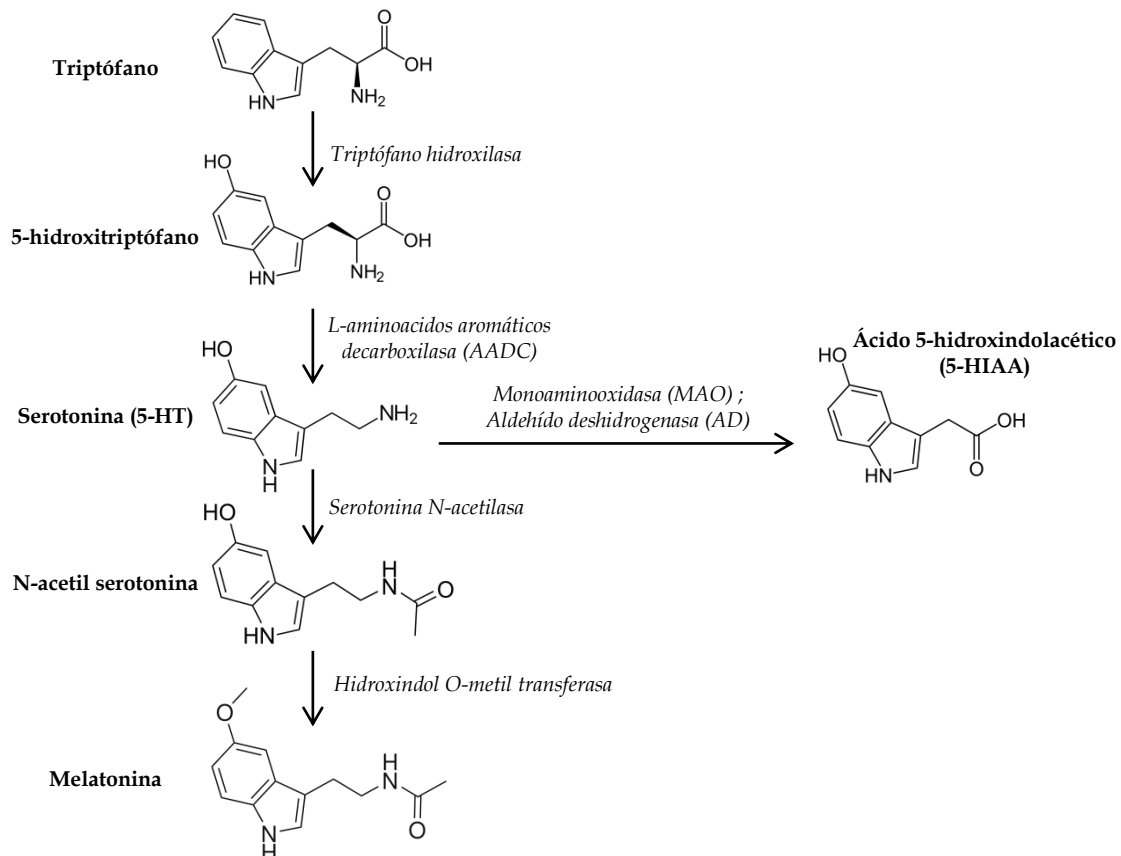


Figura 6. Vía de síntesis de las indolaminas de las cuales el NT principal es la 5-HT. Adaptado de Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

### 5.2.2. Tipos de receptores

Están descritas 7 familias de receptores de 5-HT (5-HT<sub>1-7</sub>). Excepto para los receptores 5-HT<sub>3</sub> que son receptores ionotrópicos, es decir ligados a canal iónico, el resto son acoplados a proteínas G. Estos receptores 5-HT<sub>3</sub> se encuentran principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo y la medula espinal (Carrasco & Van de Kar, 2003; Millan, 2003).

Los de la familia 5-HT<sub>1</sub> son acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> y por lo tanto actúan inhibiendo la adenil ciclasa. Se encuentran ampliamente distribuidos por el SNC, principalmente en el hipocampo, los núcleos del rafe, la corteza cerebral, la amígdala, el hipotálamo o el núcleo estriado (Kandel et al., 2013).

Los de la familia 5-HT<sub>2</sub> están acoplados a proteínas G<sub>q/11</sub> y estimulan la fosfolipasa C. Estos se encuentran principalmente en los ganglios basales. El resto de receptores están acoplados a proteínas G<sub>s/o</sub> que actúan activando la adenil ciclasa y su distribución no está tan clara, pero se contempla en la corteza cerebral y en el hipocampo, entre otros (Carrasco & Van de Kar, 2003).

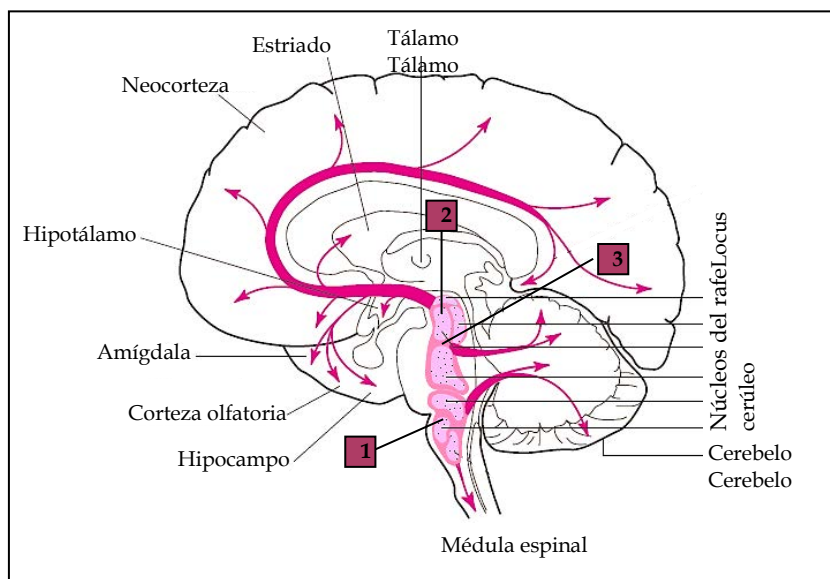
### 5.2.3. Sistema serotoninérgico

Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del rafe del tronco encefálico. Las proyecciones de estas células se distribuyen ampliamente por el encéfalo, hipotálamo y la médula espinal.

Los núcleos más caudales inervan la médula espinal y el cerebelo (señalizado con el número 1 en la Figura 7), mientras que los núcleos rostrales, el rafe dorsal y medial, inervan el resto de SNC (número 2 en la Figura 7), incluyendo también el cerebelo (número 3 en la Figura 7), mediante proyecciones bastante difusas. Pese a que hay cierto solapamiento en sus terminales nerviosos, el núcleo del rafe dorsal inerva principalmente regiones de la corteza cerebral, la amígdala, núcleo estriado y los núcleos dopaminérgicos del VTA y la sustancia negra. El medial, en cambio, inerva estructuras relacionadas con el control de las emociones como el hipocampo o el hipotálamo (Kandel et al., 2013; Millan, 2003).

Las proyecciones al prosencéfalo, como la amígdala, el hipotálamo, el hipocampo o el núcleo estriado, regulan los ciclos de sueño y vigilia, la conducta afectiva, el consumo de alimentos, la termorregulación y la conducta sexual.

Por otro lado, las proyecciones al tronco encefálico y a la medula espinal regulan el tono de los sistemas motores y la percepción del dolor (Purves et al., 2004).



**Figura 7.** Proyecciones serotoninérgicas en el cerebro. Etiquetas: **1** = proyección del núcleo del rafe caudal a la médula espinal, **2** = del núcleo del rafe dorsal a múltiples regiones del SNC, **3** = del núcleo del rafe dorsal al cerebelo. Adaptado de Nestler, Hyman, y Malenka 2009.

### *Vías serotoninérgicas, estrés y emociones.*

Disfunciones en la neurotransmisión serotoninérgica en el SNC están asociados con trastornos emocionales, como la depresión, la ansiedad o trastornos obsesivos-compulsivos. Además, las

neuronas serotoninérgicas tienen influencia en la regulación de la función neuroendocrina, y en la respuesta a estrés (Carrasco & Van de Kar, 2003; Tanaka et al., 2000).

Las neuronas del núcleo del rafe se encargan de mediar la respuesta al miedo, la ansiedad, el estrés y la función cognitiva mediante las proyecciones serotoninérgicas a diferentes regiones como la corteza frontal, el hipocampo, la amígdala o el hipotálamo (Millan, 2003).

Se dan aumentos extracelulares en los niveles serotoninérgicos en estas regiones tras la exposición a varios estresores, la ansiedad y/o el miedo. Paralelamente, está descrito que disminuciones en la actividad serotoninérgica en el SNC lleva a desordenes emocionales como la ansiedad y la depresión, por lo que su acción es clave en la capacidad de hacer frente a estímulos estresantes (Albert, Vahid-ansari, & Luckhart, 2014; Carrasco & Van de Kar, 2003; Tozawa, Tanaka, & Sato, 2016).

En el hipocampo, la activación de los receptores serotoninérgicos produce un incremento en la expresión de los receptores de GCs que actúan retroinhibiendo la función del eje HPA (Andrews & Matthews, 2004). La adaptación a un estrés crónico sucede tras el incremento de los niveles de 5-HT en esta región, que permite restaurar el funcionamiento neuronal y hacer frente y adaptarse al estrés reduciendo los efectos ansiogénicos de los estímulos estresantes (Joca et al., 2007a).

Por otro lado, las proyecciones de los núcleos del rafe al PVN actuarían activando la función del eje HPA (Andrews & Matthews, 2004).

#### **5.2.4. Señalización y efectos de los receptores**

La unión de NT a los receptores metabotrópicos en las membranas de las neuronas postsinápticas activa cascadas enzimáticas a través de segundos mensajeros que producen la fosforilación y/o desfosforilación de proteínas que conllevarán respuestas fisiológicas al actuar sobre la actividad enzimática, los canales iónicos o las proteínas del citoesqueleto. Estas cascadas de señalización por fosforilación y desfosforilación cuentan con la acción de distintas proteínas quinasas. Las MAP quinasas (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) están extensamente distribuidas por el SNC y regulan múltiples funciones. Las más comunes son ERK1 y 2 (del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*) que se encargan principalmente del crecimiento y diferenciación celular y la p38 MAPK y que es un mediador de inflamación y apoptosis (Shen, Tsimberg, Salvadore, & Meller, 2004). La acción de estas proteínas provoca la activación de factores de transcripción, como la proteína CREB que es un activador transcripcional de amplia distribución, que regula muchos genes entre los que destacan el gen temprano inmediato c-fos, la neurotrofina BDNF (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), la enzima tirosina hidroxilasa y varios neuropéptidos (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004).

**c-Fos** es un factor de transcripción que en células en reposo está presente en una concentración muy baja. La inducción de su expresión se produce por distintas vías, como por la acción de factores neurotróficos, de NT, la despolarización de la membrana o el incremento de calcio intracelular (Kovács, 1998). Después de la estimulación de la célula diana, las cantidades de c-Fos se incrementan muy notoriamente en 30-60 minutos, y desaparecen a las 2-4 h (Pacák & Palkovits, 2001), por lo tanto se trata de un gen temprano. Su acción se realiza sobre genes de respuesta retardada, que son aquellos cuya expresión depende de la síntesis inicial de c-Fos.

La inducción de la expresión de c-Fos se observa en diferentes regiones cerebrales, que a su vez son áreas que muestran cambios tras la exposición a estímulos estresantes como el manejo o que median la respuesta neuroendocrina, autónoma y conductual al estrés (Kovács, 1998).

## 6. Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos o neurotrofinas se originan en los tejidos diana y regulan la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia de las neuronas. Están descritas 5 neurotrofinas NGF, BDNF, NT3, NT4/5 y NT6 que al interactuar con los receptores transducirán la señal de su unión regulando la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia de las neuronas. Esta señalización es mediada por vías de fosforilación que activan cascadas intracelulares de señalización como Ras-Raf-ERK. Estos eventos, a su vez, influenciarán eventos transcripcionales, como la inducción del factor de transcripción CREB (Chao, 2003; Shen et al., 2004).

NGF está involucrado en la diferenciación, la supervivencia y la conectividad sináptica de neuronas simpáticas y sensitivas, BDNF participa en la supervivencia y crecimiento de neuronas tanto sensitivas como parasimpáticas una actividad que comparte también la neurotrofina 4/5 y la neurotrofina 3 (NT-3) es la más ampliamente distribuida por el SNC y juega un papel importante en desarrollo neuronal (Kandel et al., 2013).

El BDNF es el factor neurotrófico más abundante en el SNC de mamíferos y su expresión está regulada positivamente por la proteína quinasa A, activada a su vez por la adenil ciclasa, y por las concentraciones de calcio intracelulares (Millan, 2003).

Es importante en el desarrollo neuronal y también está asociado con neuroprotección y plasticidad neuronal. Numerosos estudios han descrito su función como mediador de la respuesta a estrés en el SNC, entre los que destaca sus niveles reducidos en animales sometidos a estrés (Bondar & Merkulova, 2016; Huang & Reichardt, 2003; Nikulina, Johnston, Wang, & Jr, 2014). Principalmente destaca su menor expresión ante una situación de estrés agudo o crónico en el hipocampo y la amígdala (Millan, 2003). Su expresión se ve aumentada tras el suministro en estas regiones de inhibidores de la recaptación de la 5-HT y la NA, utilizados para combatir estados ansiogénicos, poniendo de manifiesto su relevancia en la capacidad de hacer frente a la depresión, la ansiedad o

el estrés (Duman, 2004). También destaca regulando otros procesos como la supervivencia neuronal, la migración, la diferenciación, el crecimiento axonal y dendrítico, la formación y regulación de sinapsis, y funciones cognitivas como la consolidación de la memoria (Huang & Reichardt, 2003; Martinowich & Lu, 2008). Estudios más concretos han destacado su función en regiones más específicas, como la neurogénesis en el hipocampo causada por un enriquecimiento ambiental (EE) (Jain et al., 2012; Rossi et al., 2006).

## **7. Bienestar animal y estrés**

El bienestar animal y el estrés son factores importantes en producción animal, tanto por las implicaciones económicas como por la percepción pública de las condiciones de cría, transporte y sacrificio (Grandin, 1997).

La ciencia del bienestar animal nació como un campo multidisciplinar en los años 70 a consecuencia de los cambios en los sistemas de producción. En un principio solo incluía el comportamiento animal y el estrés fisiológico, pero más adelante se incorporaron otros campos como la epidemiología, la nutrición, la microbiología y la psicología comparativa entre otros (Fraser et al., 2013).

El Farm Animal Welfare Council definió en 1979 y revisó en 1992 Las Cinco Libertades para garantizar el bienestar de los animales de cría, las cuales han promovido mejoras en el sistema de cría, alojamiento y manejo de los animales: 1) ausencia de sed, hambre y malnutrición; 2) ausencia de incomodidad física y térmica; 3) ausencia de enfermedades y lesiones; 4) libertad para expresar un patrón de conducta normal y 5) ausencia de miedo, dolor y estrés (Farm Animal Welfare Council 1992).

Hay discrepancias entre las posibles definiciones de bienestar animal, pero este concepto se suele relacionar con el estado psicológico del individuo y su relación con el ambiente exterior e interior. Concretamente, el bienestar animal viene determinado por el resultado obtenido en los intentos del individuo de adaptarse al medio que lo rodea. Esta definición implica que el bienestar es una característica intrínseca del animal, que puede variar de muy pobre a muy bueno, así como a lo largo de la vida del animal (Broom, 1986). Además se considera que el bienestar es bueno si el individuo logra adaptarse al entorno con el mínimo esfuerzo y coste biológico. Si no logra adaptarse y muere o pierde capacidad de reproducción o de crecimiento, el bienestar es pobre. Por otro lado, si el animal consigue adaptarse con cierto coste biológico se considera que está estresado (Broom, 1991).

Debido a la dificultad de estudiar directamente las emociones de los animales, se infiere su estado de bienestar y estrés mediante mediciones relacionadas con ello. Estas mediciones incluyen

variables fisiológicas, de comportamiento, de producción y de patología con la finalidad de estudiar las emociones, el estrés y la adaptación psico y fisiopatológica.

## 7.1. Causas del estrés en producción porcina

El incremento de demanda de productos animales ha llevado al uso de sistemas intensivos de producción que han demostrado ser fuente de estrés y de pérdida de bienestar en animales (Martínez-Miró et al., 2016; E. M. C. Terlouw et al., 2008).

Hay varias situaciones durante la vida de los animales en las que son sometidos a posibles estresores:

- **Estrés metabólico:** producido por restricciones de agua o comida, normalmente descrito en cerdas reproductoras (Einarsson, Brandt, Lundeheim, & Madej, 2008).
- **Estrés ambiental:** en los sistemas de producción intensiva existe la dificultad de mantener unas condiciones de temperatura, humedad, luz, concentración de gases e intensidad de sonidos. Además, estos sistemas suelen ser ambientes empobrecidos que impiden el desarrollo de la conducta natural de los animales (Fernandez et al., 2015).
- **Estrés por manejo:** el manejo de los animales puede producir estrés agudo. En concreto, la reagrupación y mezcla de los cerdos durante su ciclo productivo conlleva a la lucha para restablecer la jerarquía social, produciendo estrés agudo e incluso crónico (estrés social) si hay reorganizaciones repetidas (Verdon et al., 2015).
- **Estrés por transporte:** durante el transporte de los animales a otras granjas o al matadero se exponen a numerosos eventos estresantes como la salida de su hábitat, la carga y descarga del camión, habituación a distintas condiciones de temperatura, humedad, ruido o vibración (Einarsson et al., 2008; Warriss, 1998).
- **Estrés en matadero:** el estrés en el matadero puede ser de distintos orígenes, algunos de ellos descritos anteriormente. Por un lado hay estresores de origen físico, como el transporte largo y brusco, privación de agua y comida, cambios de temperatura y calidad del aire o agresión. También hay estresores de origen psicológico, como el estrés social por mezcla de grupos (Martínez-Miró et al., 2016).

## 7.2. Marcadores de bienestar y estrés animal

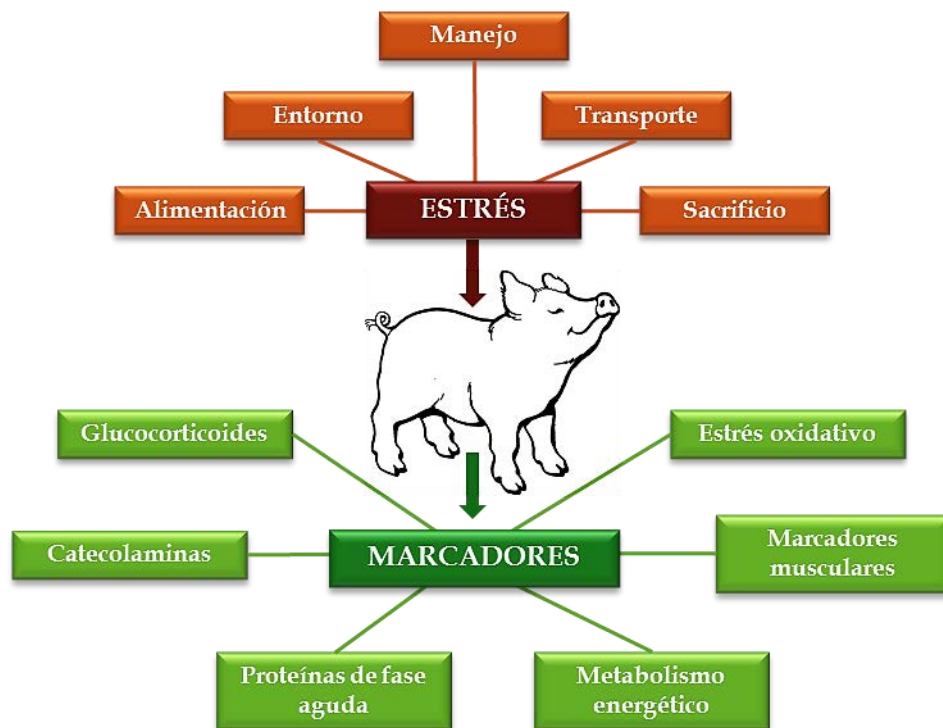
Es de gran importancia en la investigación veterinaria determinar buenos marcadores que permitan evaluar el grado de bienestar de un animal, tanto para introducir mejoras en este, como para la prevención y el tratamiento de enfermedades de animales domésticos y de granja y el conocimiento de los procesos moleculares implicados en la respuesta a estrés. Un buen marcador debe ser exacto, sensible y específico para permitir la discriminación de los estados de bienestar y/o estrés de los animales (Moore, Kirwan, Doherty, & Whitfield, 2007). En la Figura 8 se esquematizan los factores causantes de estrés y/o pérdida de bienestar y los marcadores

estudiados para evaluarlo. Por desgracia, actualmente no existe ningún marcador que cumpla con los criterios de objetividad y especificidad.

- **GC:** los niveles de GC en sangre, concretamente el cortisol en cerdos, es uno de los biomarcadores más utilizado para la valoración del estrés, a pesar de su gran variabilidad (Mormède et al., 2007). Su secreción está afectada por la actividad circadiana, puede variar por factores que no suponen una amenaza, existe gran variabilidad interindividual y su propia obtención puede iniciar una respuesta al estrés (Grandin, 1997). Estos inconvenientes limitan su aplicabilidad en la práctica. Por este motivo, también se ha recurrido a su determinación en otros fluidos: en la saliva como marcador de estrés agudo y en el pelo o las heces como marcador de estrés crónico (Russell, Koren, Rieder, & Van Uum, 2012; Sheriff, Krebs, & Boonstra, 2010).
- **Catecolaminas:** los niveles de catecolaminas en plasma se han relacionado con estrés fisiológico y actividad física, siendo utilizados como marcadores de bienestar, ya que la activación del eje SAM produce la liberación transitoria de catecolaminas, NA y A, al plasma (Murata, Shimada, & Yoshioka, 2004). Sin embargo, su presencia en plasma es transitoria por lo que su uso también se ve limitado.
- **Proteínas de fase aguda (APP):** las APP son un grupo de proteínas plasmáticas cuya concentración cambia en respuesta a inflamación, infección y estrés físico o psicológico. Son sintetizadas en el hígado y liberadas al sistema circulatorio para restaurar la homeostasis del organismo. Son una herramienta de diagnóstico de enfermedades en cerdo, especialmente para la detección de inflamación, pero también se han estudiado como marcadores de estrés. Murata estableció una hipótesis ligando la activación del eje SAM que produce la liberación de catecolaminas y la del eje HPA con la inducción de la producción hepática de APP (Murata et al., 2004). En cerdo toman especial interés la proteína C-reactiva (CRP), el amiloide A sérico, la Pig-MAP o la haptoglobina (Hp), habiéndose descrito resultados contradictorios en su respuesta a estrés (A Marco-Ramell et al., 2011; Martínez-Miró et al., 2016). Aunque son aceptados como marcadores de estrés, su inespecificidad plantea un problema en lo que se refiere a su aplicación práctica.
- **Metabolismo energético:** durante la respuesta al estrés se produce la movilización de reservas energéticas, como la glucosa a partir de glucógeno, o los triglicéridos a partir de los cuales se obtendrá glicerol y ácidos grasos. También incrementa el catabolismo de proteínas que provocará el aumento de los niveles de urea plasmáticos.
- **Marcadores musculares:** las lesiones y hematomas alteran la membrana celular y provocan la liberación de enzimas de origen muscular como la creatina quinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa.



- **Estrés oxidativo:** se ha descrito que un bienestar pobre puede alterar el equilibrio oxidativo presente en el organismo. El estrés oxidativo describe una situación de ruptura del equilibrio oxidativo de la célula en condiciones fisiológicas debido a que las defensas antioxidantes no son capaces de detoxificar los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) creados (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Esto puede deberse a una generación excesiva de moléculas prooxidantes o una pérdida de moléculas antioxidantes. La mayor consecuencia del estrés oxidativo por el aumento de ROS es el daño celular a macromoléculas, como la modificación de lípidos, DNA y proteínas que conlleva a la pérdida de su función biológica. Para medir el grado de estrés oxidativo se pueden cuantificar estas modificaciones sufridas en macromoléculas, como la peroxidación lipídica o los grupos carbonilos en las proteínas, o bien la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), o la glutatión peroxidasa (GPx).



**Figura 8.** Causantes de estrés o pobre bienestar en ganado porcino y los marcadores clásicos utilizados para evaluarlo.

### 7.3. Enriquecimiento ambiental

Como se ha descrito anteriormente, condiciones pobres de alojamiento conllevan la pérdida de bienestar animal, por lo que se han utilizado estrategias de EE para mejorarlo. El EE es definido

como la exposición a mayores estímulos físicos y/o sociales de los que se recibirían en unas condiciones estándar de alojamiento.

Los primeros estudios de EE fueron realizados en ratas por Rosenzweig, Renner, Bennett, Diamond y colegas (Crofton, Zhang, & Green, 2016; Rosenzweig & Bennett, 1996). Pretendían demostrar que el cerebro adulto también tenía cierto grado de plasticidad, y alojando ratas en condiciones enriquecidas observaron que tenían la corteza más fina, más conexiones dendríticas y mayores habilidades cognitivas que las ratas criadas en condiciones de aislamiento. A partir de estos experimentos, otros grupos se interesaron por los estudios en EE, debido a la poca manipulación de los animales requerida y de su utilidad como modelo animal en múltiples campos. Los experimentos en ratas normalmente consisten en alojar a los animales en jaulas más grandes con objetos novedosos y contacto social con otros individuos. Pero existe poca consistencia entre los protocolos de diferentes laboratorios y resulta difícil comparar los experimentos.

Posteriormente se han ido realizando estudios con otras especies animales. Concretamente en cerdos, es un tema clave el estudio de como las condiciones de alojamiento pueden afectar el bienestar del animal así como su capacidad de hacer frente a los diferentes tipos de estrés a que es sometido durante el manejo y sacrificio (Jong et al., 2000; Lebret, Ecolan, Bonhomme, Méteau, & Prunier, 2015; Millet, Moons, Oeckel, & Janssens, 2005; Weerd & Day, 2009).

Algunas de las estrategias utilizadas son el incremento de espacio, la incorporación de materiales naturales en el lecho o suelo, incluir elementos que permitan el ejercicio físico y el juego o combinar la producción intensiva con pasturas en el exterior (Brenes, Rodríguez, & Fornaguera, 2008; Simpson & Kelly, 2011).

Estas mejoras permiten a los animales la expresión de sus conductas naturales a través de la exploración y el control sobre su ambiente traduciéndose en una mejora del bienestar animal. También se producen mejoras en la memoria, el aprendizaje, las habilidades cognitivas e incluso menor ansiedad y una mayor capacidad de afrontar el estrés y de adaptarse a nuevas situaciones (Batzina, Dalla, Tsopelakos, Papadopoulou-Daifoti, & Karakatsouli, 2014; Fernández-Teruel et al., 2002; Schrijver, Bahr, Weiss, & Würbel, 2002; Segovia et al., 2009). Estas mejoras provienen de cambios moleculares y morfológicos en el SNC, como por ejemplo en los sistemas de NT colinérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos (Arco, Segovia, Garrido, Blas, & Mora, 2007; McQuaid, Audet, Jacobson-Pick, & Anisman, 2012; Segovia et al., 2009). Como se ha comentado anteriormente, los individuos sometidos a una situación estresante muestran la activación de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica, produciéndose incrementos de los niveles de DA en la PFC. Sin embargo, si la misma exposición a estrés se realiza a individuos alojados en un entorno enriquecido, no se produce la activación de esta vía (Segovia et al., 2009).

## 8. Proteómica en cerebro

La función cerebral está regulada por interacciones multidimensionales genes-proteínas, proteína-proteína, y proteína-entorno fuertemente controladas en espacio y tiempo. Es por ello, que conocer las vías moleculares precisas de las funciones cerebrales es fundamental tanto para la neurobiología clásica como para descifrar el origen y desarrollo de los desórdenes neurológicos. En la última década ha tomado gran importancia la investigación de la expresión diferencial de proteínas en tejidos del SNC para el estudio de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas (Schubert, Föcking, Wynne, & Cotter, 2015; Sethi, Chourasia, & Parhar, 2015).

La proteómica es la ciencia que estudia el proteoma, que es el conjunto de proteínas expresadas en una célula, tejido o fluido en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas.

Estas técnicas permiten la caracterización, la identificación y la cuantificación de proteínas expresadas diferencialmente en dos o más condiciones experimentales, la caracterización de interacciones entre proteínas y la caracterización de las modificaciones postraduccionales.

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta imprescindible en el campo de la proteómica. Es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar la relación masa-carga ( $m/z$ ) y la abundancia de iones en una muestra con gran precisión. Las partes principales de que se compone un MS (Figura 9) son la fuente de iones, el analizador y el detector. Así pues, las muestras de proteínas o péptidos introducidas son convertidas a iones en fase gaseosa por la fuente de ionización (por desorción láser asistida por matriz, MALDI; o por ionización por electrospray, ESI) (Karas & Hillenkamp, 1988). En el analizador, bien sea de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo o trampa iónica, se utilizan campos electromagnéticos que separarán los iones por su relación masa/carga ( $m/z$ ) y serán medidos y digitalizados en forma de espectro de masas en el detector.

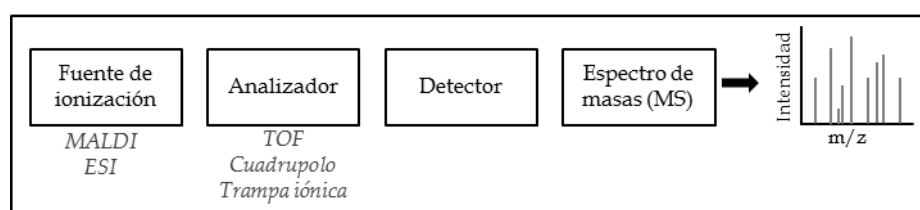
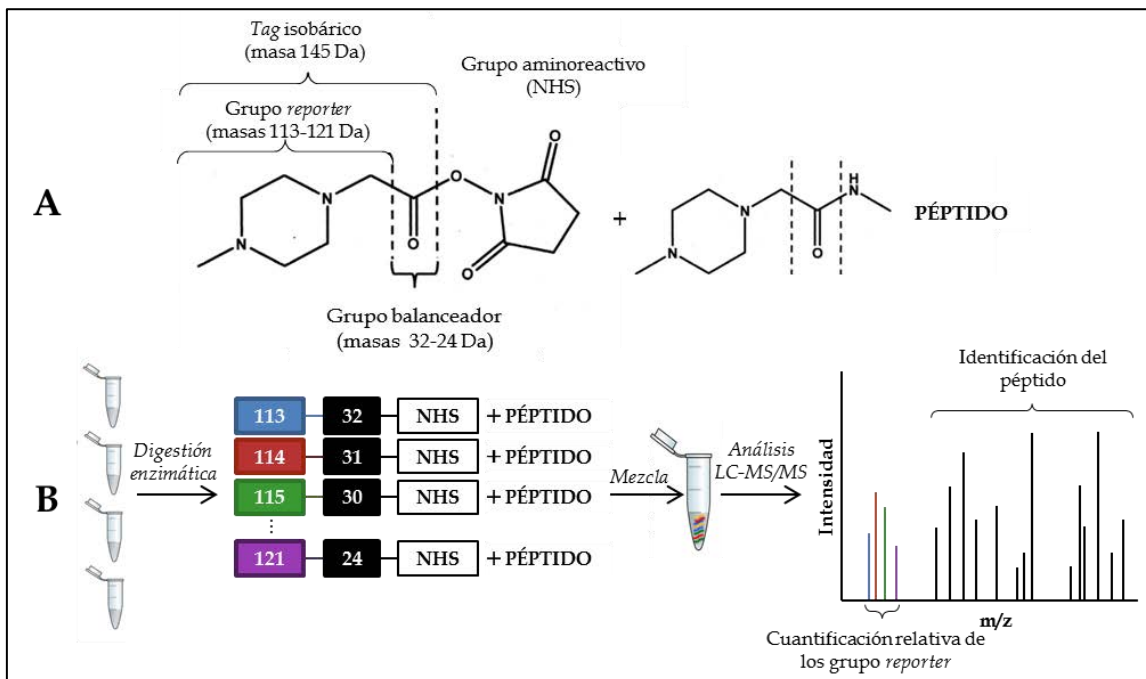


Figura 9. Esquema general de un espectrómetro de masas.

Uno de los objetivos más importantes de la proteómica es la cuantificación de la expresión diferencial de las proteínas entre condiciones experimentales, ya sea de manera relativa midiendo el cambio o *fold-change* entre condiciones, o de manera absoluta.

Para la **cuantificación absoluta** se utilizan técnicas proteómicas dirigidas que se basan en la detección de algunos péptidos exclusivos de cada una de las proteínas candidatas por MS y permite cuantificar simultáneamente un elevado número de moléculas. La **cuantificación relativa**

puede realizarse mediante técnicas basadas en un gel (*in-gel*) utilizando marcaje diferencial con fluorocromos comerciales, o métodos *off-gel* que emplean la cromatografía líquida como método de separación. Las técnicas **off-gel** dan una mayor cobertura del proteoma, tienen un rango dinámico más amplio y permite identificar proteínas poco abundantes. Entre estas técnicas *off-gel* se encuentra el marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (**iTRAQ**), que permite la comparación de cuatro u ocho muestras en el mismo ensayo. El esquema de esta técnica se representa en la Figura 10. El marcaje consta de tres elementos: una etiqueta (grupo *reporter*) que posee diferentes masas isotópicas, una región normalizadora (grupo balanceador) que compensa la masa del grupo *reporter* e iguala las masas de todos los marcajes, y un grupo de unión a grupos amino de la proteína (NHS). Las muestras marcadas con distintas etiquetas se combinan y se analizan por LC-MS. El mismo péptido de diferentes muestras tendrá la misma masa, pero cuando se fragmenta por MS/MS, además de generarse los iones específicos que permiten la identificación del péptido, se liberan los iones *reporters*, de bajo peso molecular, que difieren uno o unos pocos Da entre ellos y permite identificar la procedencia de las muestras (el marcaje). Las intensidades de estos iones *reporters* reflejan las abundancias relativas del péptido en cada una de las muestras a comparar. Por lo que la cuantificación relativa de una proteína es el resultado de combinar las abundancias relativas de los diferentes péptidos que la identifican.



**Figura 10.** Esquema de la cuantificación relativa por iTRAQ. Adaptada de Ross et al. 2004. A) Estructura del marcaje. B) Proceso de cuantificación por iTRAQ.



# **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**



## ANTECEDENTES

Desde hace unos años el interés general de nuestro grupo es la investigación del estrés y bienestar en animales de granja. Estos estudios previos se han basado en la determinación de las proteínas de fase aguda (APP), como la haptoglobina (Hp), la Pig-MAP o la proteína C-reactiva en plasma. Además también hemos realizado la búsqueda de nuevos biomarcadores plasmáticos de bienestar y estrés animal mediante técnicas proteómicas (Marco-Ramell et al. 2011; Marco-Ramell et al. 2012, 2016; Saco et al. 2003; Saco et al 2008).

Mi incorporación al grupo coincidió con el inicio de un nuevo proyecto coordinado cuyo objetivo era desarrollar medidas individuales, tanto de comportamiento como fisiológicas para la detección de situaciones de estrés. Este proyecto, denominado ANEMOMA (AGL2011-30598-C03-02) y financiado por el MINECO se llevó a cabo de forma coordinada con el Institut de Recerca Agroalimentaria (IRTA) y el SERIDA y tenía como título general “El papel del sesgo cognitivo sobre el estado emocional en porcino, su efecto sobre el bienestar y la calidad de la carne y la búsqueda de biomarcadores potenciales de estrés”. Para llevar a cabo el proyecto se desarrolló un test de sesgo cognitivo (Carreras et al., 2015) para evaluar el estado emocional en cerdos, se estudió la influencia del entorno sobre este estado emocional y a su vez se relacionó también con el bienestar y con medidas de comportamiento (Carreras, Arroyo, et al., 2016; Carreras, Mainau, et al., 2016), de la calidad de la carne (Potes et al., 2017) y los perfiles bioquímicos de marcadores clásicos de estrés en suero. Debido al papel fundamental en la integración de las emociones y la respuesta al estrés, la participación de nuestro grupo de investigación se centró mayoritariamente en la relación del estado emocional de los animales con los niveles de neurotransmisores en áreas cerebrales implicadas en el control de las emociones.

## OBJETIVOS

El objetivo general ha sido la caracterización bioquímica del suero y regiones del sistema nervioso central (SNC) en el momento del sacrificio en cerdos en distintas condiciones experimentales, combinando diferentes estresores con mejoras en las condiciones de alojamiento que pudieran repercutir positivamente en el bienestar animal.

Los objetivos específicos han sido:

- 1- Estudio de diferencias neurofisiológicas según el sexo y susceptibilidad al estrés de los cerdos:
  - Determinar cambios en los marcadores de estrés en suero debidos al estrés por el sacrificio.
  - Determinar diferencias en los niveles de estos marcadores entre sexos y la posible susceptibilidad al estrés que confiere mutaciones en el gen halotano.
  - Establecer el perfil de neurotransmisores característico de amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo



- Determinar cambios en el perfil de neurotransmisores en amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo asociadas al sexo o al genotipo halotano.
  - Determinar si el sexo o el genotipo halotano tienen influencia a la hora de afrontar el estrés por el sacrificio a través de los marcadores de suero y los neurotransmisores en el SNC.
- 2- Estudio de diferencias neurofisiológicas según el fenotipo miedoso, el estrés en el matadero y la habilidad de hacerle frente según dicho fenotipo:
- Determinar cambios en los marcadores de estrés en suero debidos al estrés por manejo previo sacrificio.
  - Determinar cambios en el perfil de neurotransmisores en amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo debidos al estrés por manejo previo sacrificio.
  - Establecer si los animales clasificados como miedosos afrontan el estrés por manejo de distinta manera mediante el estudio de marcadores en suero y neurotransmisores en SNC.
- 3- Estudio de diferencias neurofisiológicas entre cerdos alojados en condiciones intensivas o combinado con una pastura exterior y sometidos a estrés por transporte al matadero:
- Determinar cambios en los marcadores de estrés en suero debidos al estrés por transporte y a las condiciones de alojamiento que permiten el acceso al exterior.
  - Determinar cambios en el perfil de neurotransmisores, de marcadores moleculares y de estrés oxidativo en el SNC asociados al estrés por transporte y a las condiciones de alojamiento que permiten el acceso al exterior.
  - Determinar si las condiciones de alojamiento con acceso al exterior tienen influencia a la hora de afrontar el estrés por transporte al matadero a través de los marcadores de suero y los neurotransmisores y otros marcadores en el SNC.
- 4- Estudio de diferencias neurofisiológicas entre cerdos alojados en un entorno enriquecido y cerdos alojados en un entorno empobrecido
- Determinar diferencias en los marcadores de estrés en suero debidos a las condiciones de alojamiento enriquecido o empobrecido.
  - Determinar si estas condiciones de alojamiento propician diferencias en los marcadores de estrés en suero tras hacer frente al sacrificio
  - Perfil de neurotransmisores, marcadores moleculares y de estrés oxidativo en el SNC asociado al enriquecimiento ambiental.
  - Estudio proteómico en el hipocampo para establecer diferencias en proteínas neuronales en esta región causadas por el enriquecimiento ambiental.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



# MATERIAL

## 1. Determinación de parámetros bioquímicos mediante analizador automático

El análisis de los distintos parámetros bioquímicos se realizó en el analizador automático AU400 (Beckman Coulter, Hamburg, Germany) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit comercial.

**Tabla 1.** Parámetros bioquímicos determinados y el nombre del kit comercial utilizado para su cuantificación mediante el analizador automático AU400.

Parámetro	Nombre Comercial
3-hidroxiacetil-CoA	<i>Ranbut</i> (Randox)
Colesterol total	<i>Cholesterol</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Creatina quinasa	<i>Creatine kinase</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Glutación peroxidasa	<i>Ransel</i> (Randox)
Glucosa	<i>Glucose</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Haptoglobina	<i>Haptoglobin Colorimetric Assay PHASE RANGE</i> (Tridelta)
Lactato	<i>Lactate</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Lipoproteínas de alta densidad	<i>HDL- cholesterol</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Proteína C-reactiva	<i>C-reactive protein</i> (Olympus System Reagent, Beckman Coulter)
Superóxido dismutasa	<i>RanSOD</i> (Randox)
Triglicéridos	<i>Tryglicerides</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)

## 2. ELISAs comerciales

Para la determinación de BDNF, Cortisol (suero y saliva) y Pig-MAP se utilizaron los siguientes ELISAs comerciales siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para la lectura de los resultados se utilizó el lector iEMS Reader MF (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), controlado por el *software* Ascent (versión 2.6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

**Tabla 2.** Parámetros determinados mediante ELISAs y el nombre del kit comercial utilizado para su cuantificación.

Molécula	Kit comercial
BDNF	BDNF Emax® ImmunoAssay Systems (Promega, Madison, WI, USA)
Cortisol saliva	Salivary Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany)
Cortisol suero	Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany)
Pig-MAP	Pig-MAP kit ELISA (Acuvet Biotech, SL; Zaragoza, Spain)

### 3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la fase experimental fueron los siguientes:

**Tabla 3.** Listado de anticuerpos utilizados para la inmunodetección de las proteínas de interés. HRP = peroxidasa de rábano; WB = *western blot*.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Uso</b>
Anti- $\beta$ -actina - monoclonal (ratón)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	WB
Anti-c-Fos - policlonal (humano)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	WB
Anti-dinitrofenil	Sigma (St. Louis, MO, USA)	Oxyblot
Anti-ERK1/2 - policlonal (rata)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	WB
Anti-inmunoglobulina G de conejo-HRP	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	WB
Anti-inmunoglobulina G de ratón-HRP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)	WB

# MÉTODOS

En este apartado se detallan los métodos comunes empleados en los distintos estudios realizados. Los detalles característicos de cada estudio, como el diseño experimental y el análisis estadístico se describen en cada capítulo de los resultados.

## 1. Manejo de los animales

Todos los estudios se realizaron en la granja y matadero experimentales del Institut de Recerca i Tecnologia Agrolimentaries (IRTA) en Monells (Girona) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) del IRTA. Los animales disponían de agua y comida *ad libitum*, fueron examinados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

## 2. Obtención y procesamiento de las muestras

### 2.1. Saliva

Se utilizaron tubos Salivette® (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) para obtener las muestras de saliva. Se permitió a los animales morder la esponja de algodón durante aproximadamente 30 s. Posteriormente, se introdujo la esponja en el tubo Salivette y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min. Se recogió la saliva de la base del tubo, se alicuotó y se guardó a -80°C.

### 2.2. Suero

Durante el periodo de estabulación las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena cava anterior, con cuidado para evitar la hemólisis, en tubos para la extracción de sangre por sistema de vacío de 10 mL sin anticoagulante (Eurotubo™, Deltalab, Rubí, Spain). En el sacrificio, la muestra de sangre fue obtenida directamente del desangrado también en tubos de 10 mL sin anticoagulante (Eurotubo™, Deltalab, Rubí, Spain).

En ambos casos, la sangre se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente (RT) y se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. El sobrenadante se alicuotó y se conservó a -80°C hasta su análisis.

#### 2.2.1. Extracción de catecolaminas séricas

Se utilizó el método descrito por Caroldi, Jarvis, y Magos 1985 con algunas modificaciones.

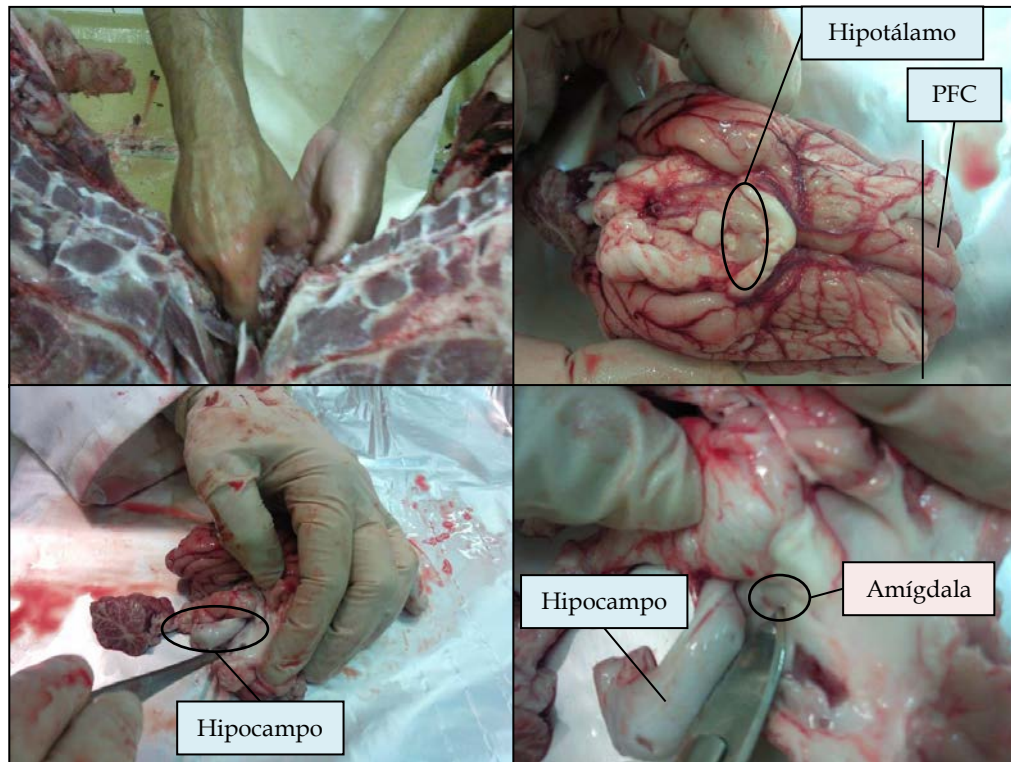
- **Activación de la alúmina:** La alúmina (Sigma, St. Louis, MO, USA) se activó previamente mediante lavados ácidos con 2 N HCl a distintas temperaturas (45 min a 90 °C, 2 x 10 min a 70 °C, 10 min a 50 °C) dejando sedimentar y descartando el

sobrenadante entre cada uno de ellos. Finalmente se lavó repetidamente con abundante agua destilada hasta alcanzar un pH de 3,4 y se evaporó overnight a 120 °C.

- **Extracción de monoaminas:** Para la extracción de monoaminas se dispusieron 100 µL de suero sobre 10 mg de alúmina activada junto a 0,5 mL de tampón 1,5 M Tris, 0,07 M etilendiaminatetraacetato (EDTA) a pH 8,6 con 3,4-dihidroxibenzilamina bromhidrato (DHBA) como estándar interno. Estas muestras se agitaron intensamente durante 30 min en un agitador horizontal y se centrifugaron a 300 x g durante 1 min a RT descartando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 mL de agua destilada y finalmente se eluyeron las monoaminas añadiendo 100 µL de medio de homogenización de HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés *high performance liquid chromatography*) (0,25 M ácido perclórico con 0,1 M NaS<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 0,25 M EDTA), vorteando intensamente y centrifugando a 300 x g durante 1 min. El sobrenadante se alicuotó y congeló a -80 °C.

### 2.3. Muestras cerebrales

Inmediatamente después del sacrificio, pasando máximo 5 min, el cráneo fue abierto y se extrajo el cerebro entero. Se diseccionaron las áreas de interés según se describe en la Figura 11 tan rápido como fue posible (menos de 2 min), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.



**Figura 11.** Serie de imágenes correspondientes a la disección de las regiones cerebrales estudiadas. Arriba a la izquierda la extracción del cerebro del cráneo del animal. Arriba a la derecha vista ventral del cerebro donde se aprecia el hipotálamo y la PFC. Abajo a la izquierda disección del hipocampo accediendo por el lóbulo parietal. Abajo a la derecha disección de la amígdala que se encuentra en la región colindante al hipocampo anterior.

Para la preparación de los extractos cerebrales se utilizaron dos métodos distintos, dependiendo de si el objetivo era únicamente la determinación de NT o la determinación de NT y proteínas a partir de las mismas muestras:

### **2.3.1. Preparación extracto cerebral para la determinación de NT**

Consiste en la precipitación de las proteínas en medio ácido. Para ello, las muestras de tejido cerebral fueron homogenizadas 1:10 en 0,25 M ácido perclórico con 0,1 M  $\text{NaS}_2\text{O}_5$  y 0,25 M EDTA con DHBA y oxalato de  $N\omega$ -metil-5-hidroxitriptamina ( $N\omega$ ) como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente. Se sonicaron al 30 % de intensidad durante 10 s intermitentes manteniendo las muestras en hielo (Branson Digital Sonifier, modelo 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA). Finalmente se alicuotaron y se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis.



### 2.3.2. Preparación extracto cerebral para la determinación de proteínas y NT

Para las muestras en las que se determinaron tanto los niveles de NT como proteínas se realizó el siguiente protocolo.

- **Extracto de proteínas:** Las muestras de tejido cerebral fueron pesadas y homogenizadas a 0,3 g de tejido/mL en el tampón de lisis consistente en 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 y 1,0 % Triton X-100 con inhibidor de proteasas (cocktail inhibidor de proteasas, Sigma, St. Louis, MO, USA) y DHBA y N $\omega$  como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente. Se sonicaron al 30 % de intensidad durante 10 s intermitentes manteniendo las muestras en hielo (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA), se alicuotaron y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.
- **Determinación de BDNF:** Para la determinación de BDNF en el hipocampo, una alícuota procedente de la preparación de las muestras del punto anterior fue diluida 1:5 en DPBS (2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O y 0,49 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O).
- **Determinación de NT:** Una alícuota de las muestras procedentes de la preparación de extracto de proteínas, se homogenizó inmediatamente con una dilución 1:2 en el tampón 0,25 M ácido perclórico con 0,1 M NaS<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 0,25 M EDTA mediante vórtex intenso, se alicuotó y se mantuvo a -80 °C hasta su análisis.

## 3. Determinación de neurotransmisores

### 3.1. Sistema HPLC

Se siguió el protocolo descrito en (Sabria et al., 2003) con algunas modificaciones. Se realizó la puesta a punto del sistema HPLC (Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Japan) equipado con la columna Chromolith Rp-18e 100 × 4,6 mm (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) con detección electroquímica (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA, USA) para la detección de NA, A, L-dopa, DA, DHBA, HVA, 5-HT y 5-HIAA. La fase móvil utilizada consistía en tampón citrato 0,5 M a pH 2,8 con 0,05 mM EDTA, 1,2 mM octilsulfato de sodio (SOS) y 1 % acetonitrilo. El flujo se estableció en 1 mL/min y el voltaje de la celda de detección a 400 mV.

Para llevar a cabo la validación del sistema cromatográfico se determinaron los parámetros de precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación de los analitos ensayados. Para la determinación de la precisión se realizaron 6 inyecciones de soluciones de los patrones a concentraciones cercanas al valor nominal en un período de tiempo corto

(intradía) o en períodos de tiempo largos (interdía). La precisión tanto intra como interdía fue establecida menor del 4 %. Para determinar la linealidad se realizaron 5 soluciones de concentraciones que cubrieron el rango con el que se trabajó posteriormente y cada una de ellas fue testada en series de 6 inyecciones. La linealidad se cumplía entre 2,5 – 80 pg/ $\mu$ L para 5-HT, 5-160 pg/ $\mu$ L para N $\omega$ , 5-240 pg/ $\mu$ L para HVA y 2,5-120 pg/ $\mu$ L para el resto de NTs, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor de 0,999 para todos ellos. Los límites de detección y cuantificación se determinaron a partir de la desviación estándar de la respuesta de la recta de calibración (término libre) y de la pendiente. El límite de detección se estableció entre 2,14 y 4,97 pg/ $\mu$ L y el límite de cuantificación entre 6,48 y 15,06 pg/ $\mu$ L para todos los analitos.

### **3.2. Procesamiento de las muestras**

Las muestras, tanto de suero como de cerebro, utilizadas para la determinación de NT mediante HPLC fueron centrifugadas a 12000 x g durante 10 min a 4 °C previamente a su inyección en el sistema cromatográfico. Se determinó la concentración de catecolaminas (NA, DA, DOPAC y HVA) e indolaminas (5-HT y 5-HIAA) en el tejido cerebral, y de NA y A en las muestras de suero. El DHBA y el N $\omega$  como estándares internos para las catecolaminas y las indolaminas respectivamente, permitieron la comparación entre muestras. Como niveles de actividad total de las vías se calcularon los valores del total del sistema dopaminérgico ( $DA_{total}$ ) como la suma de (DA, DOPAC y HVA); catecolaminérgico ( $CAT_{total}$ ) como la suma de (NA, DA, DOPAC y HVA) y serotoninérgico ( $IND_{total}$ ) como la suma de (5-HT y 5-HIAA).

## **4. Cuantificación de proteínas: método de Bradford**

La determinación de la concentración de proteínas para *western blot* (WB), se realizó con el método colorimétrico Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se leyeron las absorbancias a 595 nm en el lector de microplacas iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) con software Ascent (versión 2.6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La concentración de proteína de las muestras se determinó por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras con la recta estándar de albúmina de suero bovino (BSA, 0-150  $\mu$ g/mL), corregidas con sus respectivos blancos.

## **5. Electroforesis y Western Blot**

### 5.1. Preparación de la muestra

Se diluyeron aproximadamente 40 µg de proteína procedentes de los extractos de proteínas cerebrales (ver 2.3.2) en el tampón de muestra 5X (3 % (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), 7,5 % (v/v) β-mercaptoetanol, 65 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02 % (p/v) sacarosa y trazas de azul de bromofenol) y se hirvieron durante 10 min.

### 5.2. Electroforesis SDS-PAGE

Se polimerizaron geles de tamaño pequeño (10 x 8 x 1,5 cm) en *cassettes* de polimerización (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) con un porcentaje de acrilamida del 4% para el gel concentrador y del 12 % para el separador. Se cargaron las muestras y se corrieron a 100 V durante unos 20 min (hasta que el frente electroforético entraba en el gel separador) y a 120 V aproximadamente 2 h (hasta que el frente distaba aproximadamente 1 cm del final del gel).

### 5.3. Western blot

Los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en el sistema Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 45 min a 3,3 mA/cm<sup>2</sup>.

Se bloquearon las membranas durante 1 h a RT con 5 % (p/v) de leche descremada en 0,02 M Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl con 0,05 % (v/v) Tween-20 (TBS-T). A continuación las membranas se incubaron *overnight* con el anticuerpo primario a 4 °C, se lavaron con TBS-T, se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario y se lavaron de nuevo con TBS-T.

Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas y visualizadas por quimioluminiscencia (ECL system, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) en el sistema de imagen LAS-3000 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) y analizadas y densitometradas con el software Multi Gauge (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan).

**Tabla 4.** Condiciones utilizadas en la inmunodetección mediante *blot* de las diferentes moléculas.

Molécula	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	
β-actina	1/10000	Anti-IgG de ratón - HRP	1/20000
c-Fos	1/200	Anti-IgG de conejo - HRP	1/3000
Dinitrofenil	1/25000	Anti-IgG de ratón - HRP	1/8000
ERK1/2	1/2000	Anti-IgG de conejo - HRP	1/3000

La misma muestra fue resuelta por triplicado en todos los geles SDS-PAGE como control.

La normalización fue realizada con la densitometría correspondiente a la β-actina y con la muestra control para corregir la variación inter-gel.

## 6. Oxy-blot off-gel mediante slot blot

Se utilizó el método descrito en Robinson et al. 1999 con algunas modificaciones. La técnica se basa en la derivatización de los grupos carbonilos presentes en la proteína con derivados de hidrazinas. El más utilizado es la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que lleva a la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP) en las proteínas y permite detectarlo por métodos espectrofotométricos, HPLC, o mediante *western blot*.

El volumen correspondiente a 5 µg de proteína procedentes del extracto de proteína cerebral (apartado 2.3.2) fueron aplicadas en los pocillos del *slot blotter* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Se incubaron durante 20 min a RT y se aplicó el vacío para transferir las muestras a la membrana. Seguidamente, la membrana fue incubada secuencialmente durante 1 min en: metanol, tampón de transferencia (0,25 M Tris, 0,19 M glicina y 20 % metanol) y 2 N HCl. Se realizó la derivatización incubando la membrana en una solución de 100 mg/mL de DNPH en 2 N HCl durante exactamente 5 min y se lavó secuencialmente con metanol, tampón de transferencia y TBS-T. A continuación, la membrana fue bloqueada durante 1 h a RT con 5 % (p/v) de leche descremada en TBS-T y se procedió con el mismo protocolo empleado para Western Blot (ver 5.3).

La normalización se realizó con la densitometría de la banda de la β-actina para corregir por el contenido total de proteína. Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado en diferentes membranas.

## 7. Ensayo de peroxidación lipídica

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica en homogenados de tejido. Se midieron sus niveles siguiendo el método descrito por Wills 1966 Wills con algunas modificaciones. Las muestras procedentes del apartado 2.2.3 fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 5 % en la muestra. Se centrifugaron a 1600 x g durante 10 min a RT y el sobrenadante se añadió a un volumen igual de una solución del 0,9 % de ácido tiobarbitúrico en 5% de TCA. Se mantuvieron durante 1 h a 95-100 °C, se dejaron enfriar 10 min en hielo y se centrifugaron a 1600 x g durante 10 min a 4 °C.

Finalmente se determinó la presencia MDA en el sobrenadante leyendo su absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción molar del MDA y se expresó como nmoles de MDA/g tejido.

## 8. Análisis del proteoma de hipocampo mediante marcaje isobárico iTRAQ

### 8.1. Preparación de la muestra

Las muestras procedentes de la extracción de proteínas del hipocampo obtenidas según se describe en el apartado 2.3.2 se sometieron a un proceso de reducción/alquilación previo a la precipitación para favorecer su posterior resuspensión. Unos 700 µg de proteína (50 µL) procedentes de los extractos de hipocampo fueron reducidos durante 1 h a RT en un agitador orbital con 5 mM Tris (2-cloroetil)-fosfato (TCEP) y alquilados durante 20 min a RT en un agitador orbital en la oscuridad con 20 mM iodoacetamida (IAA). El exceso de IAA fue contrarrestado con 5 mM de TCEP durante 1 h a RT.

Las muestras se precipitaron añadiendo acetona y TCA en la proporción 1:8:1 (muestra:acetona:TCA) e incubando 1 h a -20 °C. Se centrifugaron a 18000 x g durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 1 mL de acetona, centrifugando a 18000 x g durante 15 min a 4 °C y dejando secar a RT tras el último paso. Las muestras se resuspendieron por sonicación en 200 µL de 0,5 M trietilamonio bicarbonato (TEAB) con 8 M urea a pH 8-8,5.

### 8.2. Cuantificación de proteínas

Las muestras resuspendidas en el tampón 0,5 M TEAB/8 M urea se cuantificaron con el *kit* Micro BCA™ Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La cantidad de proteína de las muestras se determinó por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras a 550 nm con la curva estándar de BSA (0-200 µg/mL), corregidas con sus respectivos blancos. Para la lectura de los resultados se utilizó el lector de microplacas iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) con *software* Ascent (versión 2.6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### 8.3. Reducción, alquilación y tripsinización

Se llevaron 85 µg de proteína total al volumen final de 50 µL. Paralelamente se creó un *pool* de todas las muestras que fue empleado como control. Esta cantidad de proteína fue reducida con 5 mM TCEP durante 1 h a 35 °C en un agitador orbital y alquilada con 20 mM IAA durante 20 min a RT en un agitador orbital en la oscuridad. El exceso de IAA fue contrarrestado incubando con 5 mM de TCEP durante 1 h a 35 °C. Se añadieron 250,4 µL de tampón 0,5 M TEAB para reducir la concentración de urea a niveles por debajo de 1,5 M y

permitir así la tripsinización con 2,55 µg de tripsina (3 % (p/p) tripsina en proteína a digerir) incubando 20 h a 37 °C.

#### 8.4. Marcaje isobárico de los péptidos.

Una vez bloqueada la digestión de proteínas mediante inhibición de la tripsina por tratamiento ácido (0,1 % de ácido fórmico), se desalaron las muestras con *PolyLC tips C18* (PolyLC INC, Columbia, MD, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se guardó una alícuota de los péptidos trípticos para comprobar que la digestión se había realizado correctamente. El resto de la muestra fue evaporada en un sistema *SpeedVac* y resuspendida en 30 µL 0,5 M TEAB. El marcaje isobárico de los péptidos fue realizado con el *kit iTRAQ Reagents - 8plex* (AB Sciex, Framingham, MA, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Una vez finalizado el marcaje, las muestras fueron combinadas, desaladas con *PolyLC tips C18* y *SCX* (PolyLC INC, Columbia, MD, USA), evaporadas y resuspendidas en 5 % (v/v) acetonitrilo, 1 % (v/v) ácido fórmico.

#### 8.5. Cuantificación e identificación

La mezcla peptídica fue analizada usando el espectrómetro de masas *Orbitrap Fusion Lumos Tribrid* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un sistema nano-UPLC (*EASY-nanoLC 1000 liquid chromatograph*, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Se cargaron los péptidos en la columna y fueron separados mediante cromatografía de fase reversa en columna de 50 cm (*EASY-Spray*; 75-µm ID, *PepMap RSLC C18*, 2-µm partículas, 45 °C, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), con un gradiente inicial del 97 % de solvente A (0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua) y del 3 % de solvente B (0,1 % (v/v) ácido fórmico en acetonitrilo). Se realizó un gradiente creciente del solvente B con un flujo de 300 nL/min del 3 % al 35 % en 270 min y del 35 % al 50 % en 5 min.

En el espectrómetro de masas, se operó en el modo de ionización positiva con un voltaje de 2,4 kV y 275 °C. Los picos más intensos de cada ciclo de escaneo (400-1600 m/z) fueron seleccionados para la fragmentación por disociación inducida por colisión (CID) a una energía de colisión del 35 % y una ventana de aislamiento de 0,7 Da (MS<sup>2</sup>). Para el análisis MS<sup>3</sup> para la cuantificación de los *reporter ions* de iTRAQ, múltiples fragmentos de iones del escaneo previo fueron co-seleccionados y fragmentados por disociación inducida por colisión de alta energía HCD con una energía de colisión del 65 % y una ventana de selección de 2 Da. Los espectros MS obtenidos fueron analizados por el *software Xcalibur v3.0.63* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) empleando el buscador *Proteome Discoverer v2.1.0.81* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), con la base de datos Uniprot de *Sus Scrofa* con contaminantes, y la base de datos inversa para establecer el *false discovery rate* (FDR). Los parámetros incluidos en la búsqueda fueron tripsina (aceptando dos sitios de escisión

perdidos), carbamidometil en cisteínas e iTRAQ 8-plex en N-terminal de los péptidos como modificaciones estáticas; y oxidación de metioninas y acetilación en N terminal de las proteínas como modificaciones dinámicas. Las tolerancias establecidas fueron de 10 ppm para la masa peptídica y de 0,6 para el MS/MS. Péptidos con un q-valor < 0,1 y un FDR < 1 % fueron considerados identificaciones positivas con un elevado nivel de confianza.

## 8.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado siguiendo la metodología propuesta por Chick et al. 2016. Las intensidades de los *reporter ions* fueron utilizados para la cuantificación de proteínas. Los péptidos únicos (aquellos que no son compartidos entre diferentes grupos de proteínas), fueron considerados para el análisis cuantitativo y estadístico.

Se realizó la normalización de la cuantificación peptídica dentro de cada experimento iTRAQ. Para ello, se sumaron los valores de abundancia de todos los péptidos identificados dentro de ese experimento para cada canal (*reporter ion*). El canal con mayor abundancia se tomó como referencia y la abundancia del resto se corrigió por el factor constante de este con el fin de que la abundancia total fuese la misma para todos los canales.

La cuantificación de proteínas se obtuvo de la suma de las intensidades de los péptidos normalizados anteriormente.

Para la normalización entre los 6 experimentos iTRAQ, se realizó normalización por cuantiles.

DanteR (Pacific Northwest National Laboratory) se utilizó para el pre-procesado, visualización y la cuantificación relativa de los datos. El análisis de la varianza (ANOVA) fue realizado a nivel de proteína usando un modelo lineal considerando el factor alojamiento (enriquecido o empobrecido) como primer factor y el corral como segundo para minimizar el sesgo experimental.

Los *P* valores fueron ajustados para el test múltiple utilizando la corrección de Benjamini & Hochberg FDR.

Las proteínas diferenciales se establecieron en un *P* valor ajustado menor de 0,05 y un *fold change* menor que 0,8 (*down*) o mayor que 1,25 (*up*).

# **RESULTADOS**





# CAPÍTULO 1

## SEXO Y SUSCEPTIBILIDAD A ESTRÉS

Hay varios factores causantes de estrés ampliamente reconocidos y estudiados en cerdo, como la reubicación, la mezcla, el transporte o el sacrificio. El estrés ocurre en muchos puntos de la vida del animal y puede producir carne pálida, blanda y exudativa (PSE, *pale-soft-exudative*), lo que se traduce en un coste económico. Está descrito que la susceptibilidad al estrés tiene un factor genético identificado como mutaciones en el gen que codifica el receptor de la rianodina 1 (RYR1), también conocido como gen halotano. Los cerdos homocigotos recesivos (nn) tienen sensibilidad al halotano y bajo una condición de estrés desarrollan el síndrome de estrés porcino que está caracterizado por rigidez de la musculatura esquelética y acidosis, entre otros, y conlleva una pérdida de la calidad de la carne y un incremento de la mortalidad presacrificio (Bates, Doumit, Raney, Helman, & Ernst, 2012)(Bates et al., 2012).

### 1. Diseño experimental

En este estudio 48 animales cruce de hembras Large White x Landrace con machos Pietrain procedentes de la misma granja comercial fueron divididos en 4 grupos de 12 animales cada uno según su genotipo halotano (libre (NN) o portador (Nn)) y sexo (hembra o macho). Se consideraron por tanto cuatro grupos: hembras libres (hembras NN), machos libres (machos NN), hembras portadoras (hembras Nn) y machos portadores (machos Nn). A las 9 semanas

de vida, los cerdos fueron transportados a las instalaciones experimentales del IRTA (Monells, Girona, España) donde se estabularon en 8 corrales de 6 animales cada uno manteniendo la separación por sexo y genotipo.

Todos los grupos se instalaron en corrales con *slat* total (5 m x 2,70 m) con luz natural y temperatura ambiental de  $22 \pm 3$  °C, bebederos de acero (15 cm x 16 cm) conectados con chupete de acero y un comedero de hormigón (58 cm x 34 cm) con 4 posiciones de alimentación, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Fueron examinados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

Se realizó una extracción sanguínea en la semana 22 de vida (una semana antes del sacrificio), que corresponderá a la medida basal. En la semana 23 se transportaron los animales al matadero experimental, donde fueron aturdidos por parejas mediante exposición durante 3 min a 90 % de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico y posteriormente desangrados. Tras el sacrificio se obtuvo la segunda muestra de sangre (en el desangrado), así como las muestras cerebrales, tal y como se describe en el apartado 2.3 de Materiales y métodos.

## 2. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo en el *software* SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en  $P < 0,05$  y la tendencia fue considerada en  $0,05 \leq P \leq 0,1$ . Los datos descriptivos son presentados con la media y el error estándar (media  $\pm$  SE).

Se realizó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

### 2.1. Estadística univariante

#### 2.1.1. Muestras de suero

Se utilizó el modelo lineal general (GLM) de medidas repetidas para poder comparar los valores del sacrificio con su nivel basal. En el modelo factorial, cada animal fue introducido como unidad experimental, las distintas tomas de muestra como efecto intra-sujetos, el sexo (hembra o macho) y el genotipo halotano (NN o Nn) como efectos inter-sujetos, así como las múltiples interacciones. Posteriormente se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni para aquellos casos en los que la interacción entre efectos era significativa.

#### 2.1.2. Neurotransmisores

Las variables normalmente distribuidas fueron analizadas usando el método UNIANOVA de SPSS con ajuste de Tukey. Las variables con distribución Poisson o multinomial fueron

analizadas utilizando el método no-paramétrico GENLIN de SPSS. En todos los modelos, cada animal fue introducido como la unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron el sexo (hembra o macho) y el genotipo halotano (NN o Nn), y su interacción (Sexo\*Genotipo; S\*G). Además, también se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni para las interacciones significativas.

## 2.2. Análisis factorial

Se realizaron dos análisis factoriales de componentes principales (PCA). El primero de ellos con la finalidad de establecer el patrón de neurotransmisores y sus metabolitos en las áreas cerebrales del estudio y el segundo con el objetivo de reducir el número de variables totales a un número menor de factores que pudieran explicar la variabilidad muestral y el efecto del sexo y/o el genotipo.

### 2.2.1. Análisis factorial del perfil NT regional

Las relaciones entre los 7 neurotransmisores o metabolitos (NA, L-DOPA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT Y 5-HIAA) fueron incluidas en el análisis de factores comunes usando la solución para componentes principales (PCA) para identificar los factores comunes no observados que explican la diferencia entre las regiones cerebrales. Los criterios establecidos para determinar el número de factores a retener fueron: **(i)** autovalores  $> 1$  y **(ii)** total de varianza explicada acumulada mayor del 60 %. Tras la extracción inicial de factores, la matriz fue rotada ortogonalmente (método *varimax*) para mantener los factores independientes y sin correlacionar. De esta manera, cada variable tenía una alta carga (o coeficiente de correlación entre variable y factor) en un solo factor y baja o moderada para el resto. El punto de corte para considerar una variable explicativa de un factor fue una carga superior a 0,5.

Cada región cerebral de cada animal obtuvo una puntuación individual para cada factor. Esas puntuaciones factoriales están distribuidas normalmente con la media en el 0.

### 2.2.2. Análisis factorial general

En este caso, para el PCA se tuvieron en cuenta las relaciones entre las 43 variables determinadas en el estudio (NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, así como las CAT<sub>total</sub> e IND<sub>total</sub> de las 4 regiones; CK, colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, glucosa, triglicéridos, 3-hidroxitirato, Hp, CRP, Pig-MAP y cortisol en suero) para identificar los factores comunes no observados que pudieran explicar diferencias entre sexo, genotipo halotano o su interacción. Los criterios establecidos para determinar el número de factores a retener fueron: **(i)** autovalores  $> 1$ , **(ii)** total de varianza explicada acumulada mayor del 60 % y **(iii)** la interpretabilidad de las variables incluidas (Hair, Black, Babin, Anderson, &

Tatham, 2006). Tras la extracción inicial de factores, la matriz fue rotada ortogonalmente (método *varimax*) para mantener los factores independientes y sin correlacionar. De esta manera, cada variable tenía una alta carga (o coeficiente de correlación entre variable y factor) en un solo factor y baja o moderada para el resto. El punto de corte para considerar una variable explicativa de un factor fue una carga superior a 0,5.

Se asignó a cada animal una puntuación individual para cada factor. Esas puntuaciones factoriales están distribuidas normalmente con la media en el 0.

### 3. Perfil Bioquímico

Se analizaron los niveles de CK como marcador de daño muscular; de glucosa, triglicéridos y colesterol como marcadores del metabolismo energético; de las proteínas de fase aguda (APP) Hp, CRP y Pig-MAP y de cortisol en suero. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla X.

En este experimento se obtuvieron resultados correspondientes a las muestras basales y a las de sacrificio. Se plantearon 5 objetivos a la hora de realizar el análisis estadístico para estudiar las diferencias en estos parámetros: i) el efecto del sacrificio, ii) diferencias entre sexo, iii) diferencias entre genotipos; iv) diferencias al afrontar el sacrificio debidas al sexo; v) diferencias al afrontar el sacrificio debidas al genotipo.

En la siguiente tabla (tabla 5) se muestran los valores medios obtenidos para todas las determinaciones según los grupos comparados: tiempo, sexo y genotipo.

**Tabla 5.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el primer experimento: 1 semana antes del sacrificio (Basal) y en el momento del sacrificio (por filas) como media  $\pm$  SE.

Parámetro	Tiempo	Total			NN	Nn
			Macho	Hembra		
CK (U/mL)	Basal	5,82 $\pm$ 0,83	5,56 $\pm$ 1,25	6,08 $\pm$ 1,12	4,09 $\pm$ 0,66	7,54 $\pm$ 1,46
	Sacrificio	2,81 $\pm$ 0,25	2,43 $\pm$ 0,26	3,18 $\pm$ 0,42	1,92 $\pm$ 0,17	3,70 $\pm$ 0,39
Colesterol (mg/dL)	Basal	90,48 $\pm$ 1,54	87,42 $\pm$ 2,27	93,53 $\pm$ 1,91	90,28 $\pm$ 2,38	90,67 $\pm$ 1,99
	Sacrificio	91,48 $\pm$ 1,27	88,88 $\pm$ 1,59	94,08 $\pm$ 1,87	91,42 $\pm$ 1,50	91,54 $\pm$ 2,08
Glucosa (mg/dL)	Basal	89,95 $\pm$ 1,41	94,03 $\pm$ 1,70	85,87 $\pm$ 1,95	91,11 $\pm$ 2,02	88,79 $\pm$ 2,00
	Sacrificio	333,21 $\pm$ 10,57	308,38 $\pm$ 13,56	358,05 $\pm$ 14,81	326,37 $\pm$ 16,70	340,06 $\pm$ 13,18
Triglicéridos (mg/dL)	Basal	39,27 $\pm$ 1,82	44,21 $\pm$ 2,53	34,33 $\pm$ 2,25	40,04 $\pm$ 2,84	38,50 $\pm$ 2,33
	Sacrificio	50,79 $\pm$ 1,62	49,83 $\pm$ 2,07	51,75 $\pm$ 2,52	48,08 $\pm$ 2,11	53,50 $\pm$ 2,38
Hp (mg/mL)	Basal	0,39 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,07
	Sacrificio	0,39 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,08
CRP (mg/L)	Basal	6,80 $\pm$ 1,01	4,85 $\pm$ 0,90	8,74 $\pm$ 1,75	5,88 $\pm$ 1,63	7,71 $\pm$ 1,21
	Sacrificio	9,23 $\pm$ 0,93	7,20 $\pm$ 1,39	11,26 $\pm$ 1,13	7,26 $\pm$ 1,13	11,2 $\pm$ 1,39
Pig-MAP (mg/mL)	Basal	0,68 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,06
	Sacrificio	0,71 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,05
Cortisol (ng/mL)	Basal	19,53 $\pm$ 1,78	19,88 $\pm$ 2,62	19,18 $\pm$ 2,47	19,35 $\pm$ 2,42	19,71 $\pm$ 2,67
	Sacrificio	38,24 $\pm$ 2,02	38,99 $\pm$ 3,17	37,49 $\pm$ 2,57	35,32 $\pm$ 2,55	41,16 $\pm$ 3,07

La primera columna representa los valores del conjunto de individuos (n = 48). El bloque del medio representa los valores de las hembras (n = 24) y machos (n = 24) y finalmente el último bloque los valores del genotipo halotano NN (n = 24) y Nn (n = 24).

En primer lugar se analizó el efecto del sacrificio en el conjunto muestral, el efecto del sexo y el efecto del genotipo así como sus interacciones. Debido a que no se vio ninguna interacción significativa entre sexo y genotipo este efecto fue eliminado del modelo estadístico. Los resultados de este análisis se muestran en la Ttabla 6. Interacciones entre el sexo o el genotipo y el sacrificio indican o bien que los cambios observados por el efecto del sacrificio son distintos en los grupos de estudio (sexo o genotipo halotano) o bien que las diferencias entre sexos o entre genotipos halotano se dan únicamente en uno de los dos tiempos medidos, el basal o en el sacrificio.

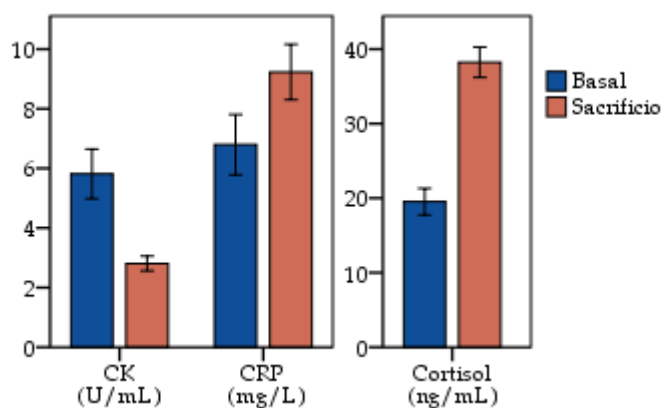
**Tabla 6.** *P* valores de los efectos evaluados para los parámetros medidos en suero del primer experimento.

Parámetro	P valores				
	Sacrificio vs Basal	Sexo	Sexo* Sacrificio	Genotipo	Genotipo* Sacrificio
CK	<b>&lt;0,001</b>	0,23	0,893	<b>0,001</b>	0,789
Colesterol	0,364	<b>0,027</b>	0,633	0,914	0,759
Glucosa	<b>&lt;0,001</b>	0,397	<b>0,001</b>	0,69	0,265
Triglicéridos	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,051</b>	<b>0,002</b>	0,44	0,173
Hp	0,074	<b>0,006</b>	0,494	0,258	0,079
CRP	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	0,721	<b>0,002</b>	0,953
Pig-MAP	0,906	0,899	<b>&lt;0,001</b>	0,796	0,118
Cortisol	<b>&lt;0,001</b>	0,685	0,627	0,952	0,272

Indicados en negrita  $P < 0,05$ . Sacrificio vs Basal = efecto del sacrificio en el conjunto de los animales; Sexo = efecto del sexo en el conjunto total; Sexo \* Sacrificio = evolución diferencial entre los sexos; Genotipo = efecto del genotipo en el conjunto total; Genotipo \* Sacrificio = evolución diferencial entre los dos genotipos.

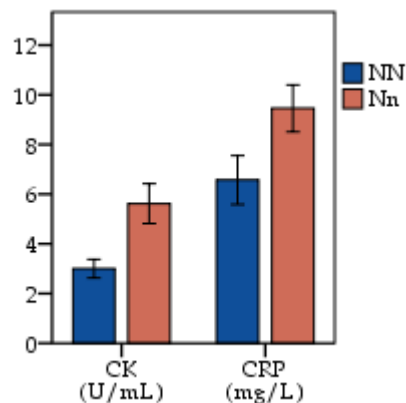
En cuanto a los parámetros que no muestran interacción, por lo que sus variaciones son debidas al efecto de solo un factor:

- La **CK** mostró niveles menores en el **sacrificio** ( $P < 0,001$ ), mientras que los niveles **CRP** ( $P < 0,001$ ) y **cortisol** ( $P < 0,001$ ) aumentaron en el momento del sacrificio (figura 13).



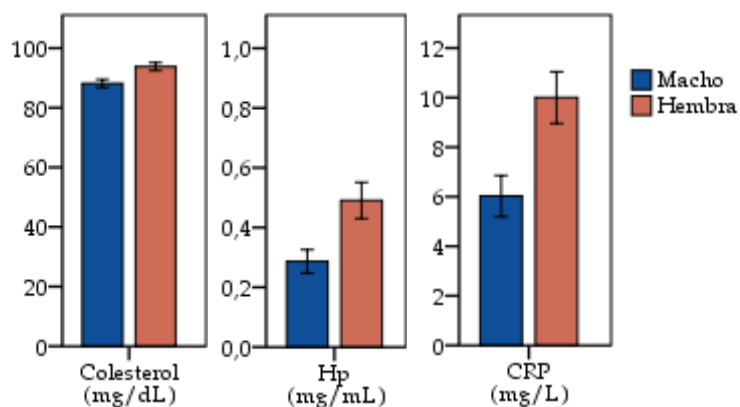
**Figura 12.** Representación gráfica de los efectos significativos del sacrificio en parámetros del suero para el primer estudio. CK, CRP y cortisol en la primera toma de muestra (basal) y en el sacrificio. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

- Los animales portadores del **gen halotano**, Nn, mostraron niveles mayores de **CK** ( $P = 0,001$ ) y **CRP** ( $P = 0,002$ ).



**Figura 13.** Representación gráfica de los efectos significativos del sexo en parámetros del suero para el primer estudio. CK y CRP en libres (NN) y portadores (Nn) de la mutación del gen halotano. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

- Para los cambios según el **sexo**, los niveles de **colesterol**, **Hp** y **CRP** son mayores en las hembras que en los machos ( $P = 0,027$ ,  $P = 0,006$  y  $P = 0,001$ , respectivamente).



**Figura 14.** Representación gráfica de los efectos significativos del sexo para el primer estudio. Colesterol, Hp y CRP en hembras y machos. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

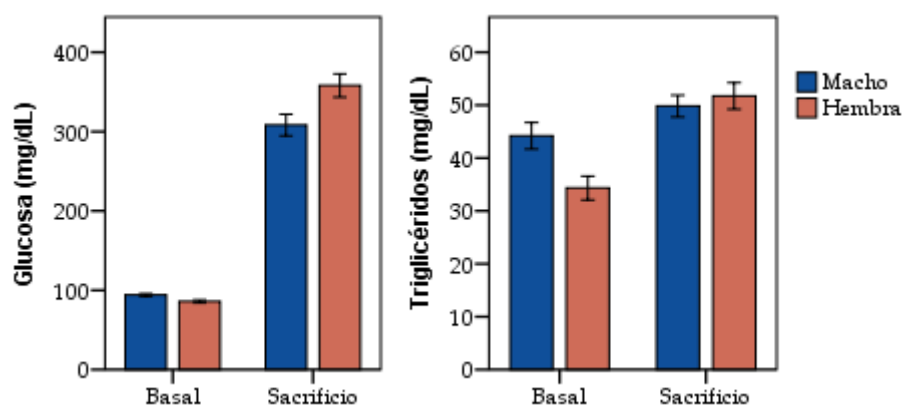
Finalmente, se observa una **interacción** entre el sacrificio y el sexo para los parámetros de **glucosa** ( $P = 0,001$ ), **triglicéridos** ( $P = 0,002$ ) y **Pig-MAP** ( $P < 0,001$ ). Para establecer a que es debida esta interacción se realizó una comparación por pares con ajuste Bonferroni (Tabla 7).

**Tabla 7.** *P* valores de las comparaciones múltiples para los parámetros medidos en suero del primer experimento. Las comparaciones múltiples son de izquierda a derecha: hembra vs macho en basal, hembra vs macho en sacrificio; basal vs sacrificio en hembras; basal vs sacrificio en machos.

Parámetro	Hembra vs macho		Basal vs sacrificio	
	Basal	Sacrificio	Hembras	Machos
Glucosa	<b>0,003</b>	<b>0,019</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Triglicéridos	<b>0,003</b>	0,618	<b>0,046</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Pig-MAP	<b>0,009</b>	<b>0,013</b>	<b>0,008</b>	<b>0,014</b>

Indicados en negrita  $P < 0,05$ .

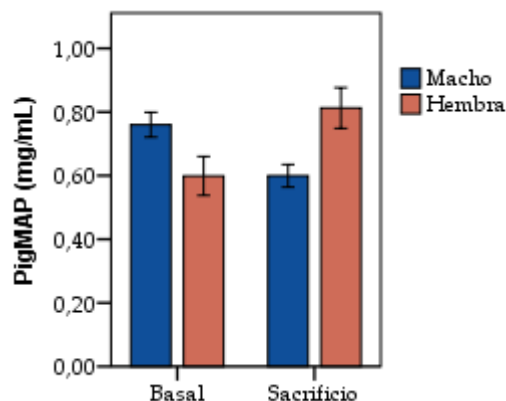
De los resultados obtenidos en el análisis estadístico y como se observa en la figura 16, los niveles de **glucosa** y de **triglicéridos** se ven incrementados por el efecto del sacrificio tanto en hembras como en machos. La interacción es significativa debido a que mientras que el nivel basal de glucosa y triglicéridos es mayor en machos que en hembras ( $P = 0,003$  para ambos), la concentración de glucosa tras el sacrificio es mayor en hembras que en machos ( $P = 0,018$ ) y la de triglicéridos se iguala.



**Figura 15.** Representación gráfica de las concentraciones de glucosa y triglicéridos en el primer experimento según sexo y en los dos tiempos de toma de muestra (basal y sacrificio). Las barras representan la media  $\pm$  SE.

Los niveles de **Pig-MAP** basales son mayores en machos que en hembras ( $P = 0,009$ ), mientras que en el sacrificio ocurre a la inversa ( $P = 0,013$ ). Este cambio es debido a que mientras que los niveles en los machos disminuyen tras el sacrificio, en hembras, aumentan.





**Figura 16.** Representación gráfica de la concentración de Pig-MAP en el primer experimento, según sexo y en los dos tiempos de toma de muestra (basal y sacrificio). Las barras representan la media  $\pm$  SE.

#### 4. Perfil de NT en las distintas áreas cerebrales

Se determinaron las concentraciones de NT de las vías de las catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, DOPAC y HVA, y 5-HIAA, respectivamente) en amígdala, hipotálamo, hipocampo y PFC mediante HPLC. Como valores totales de cada uno de los tipos de NT monoaminérgicos, se realizó la suma de todas las moléculas involucrada en la vía de las catecolaminas (*CATtotal*) y de las indolaminas (*INDtotal*).

##### 4.1. Niveles de NT monoaminérgicos y sus metabolitos en amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo

Se realizó el análisis descriptivo de los datos para obtener una imagen de los valores de las vías de NT monoaminérgicos en las 4 regiones estudiadas (Tabla 8).

Las concentraciones más altas de NA se encontraron en el hipotálamo; las de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en la amígdala y el hipotálamo.

En cuanto a las indolaminas, las concentraciones más altas de 5-HT se encontraron en la amígdala e hipotálamo.

**Tabla 8.** Concentración de los metabolitos de las vías de las catecolaminas e indolaminas en las 4 regiones de estudio. CAT<sub>total</sub> e IND<sub>total</sub> representa el valor total de cada una de las vías (n = 48; media ± SE).

Parámetro (ng/g tejido)	Amígdala	PFC	Hipocampo	Hipotálamo
NA	202,94 ± 9,00	160,68 ± 4,05	181,22 ± 5,51	2360,57 ± 160,75
L-DOPA	-	-	-	298,47 ± 28,10
DA	450,40 ± 24,48	22,67 ± 2,88	27,69 ± 1,03	536,48 ± 47,12
DOPAC	91,87 ± 4,60	13,60 ± 1,33	3,67 ± 0,28	94,67 ± 8,66
HVA	358,48 ± 14,42	62,82 ± 5,49	31,22 ± 1,59	418,29 ± 28,71
CAT <sub>total</sub>	900,75 ± 39,29	102,16 ± 9,04	63,28 ± 2,46	1347,91 ± 96,98
5-HT	1125,66 ± 47,26	314,00 ± 9,36	342,35 ± 9,85	737,63 ± 49,24
5-HIAA	311,91 ± 9,22	110,95 ± 3,81	136,44 ± 3,98	449,20 ± 38,76
IND <sub>total</sub>	1437,57 ± 53,94	424,95 ± 12,25	478,79 ± 12,89	1186,83 ± 79,67

Para definir estadísticamente estas diferencias entre regiones, se realizó un PCA. De esta manera se redujeron las siete variables determinadas en las 4 regiones de los 48 animales en el estudio (NA, DA, L-DOPA, DOPAC, HVA, 5-HT y 5-HIAA) a dos componentes que explicaron el 90,93 % de la varianza.

En la Tabla 9 se muestran los resultados del PCA, que incluyen los autovalores, el porcentaje de varianza explicado por cada uno de ellos y el total; las variables incluidas en el estudio y su factor de carga para cada uno de los dos factores. Las variables con factores de carga mayores a |0,5|, fueron consideradas las explicativas de cada componente o factor extraído. El factor 1 (PC1) está determinado por altos niveles de DA, DOPAC, HVA, 5-HT y 5-HIAA, y el factor 2 (PC2) lo está por altos niveles de NA y L-DOPA.

**Tabla 9.** Resultado del análisis de componentes principales (PCA) de las regiones del primer experimento. PC1 y PC2 corresponden a los dos factores extraídos.

	PC1	PC2
<b>Autovalor</b>	5,134	1,231
<b>Porcentaje individual</b>	55,24%	35,69%
<b>Porcentaje acumulado</b>	55,24%	90,93%
<b>Variables</b>		
NA	0,28	<b>0,94</b>
L-dopa	0,21	<b>0,96</b>
DA	<b>0,84</b>	0,47
DOPAC	<b>0,90</b>	0,30
HVA	<b>0,86</b>	0,44
5-HT	<b>0,93</b>	-0,03
5-HIAA	<b>0,79</b>	0,44

Los factores de carga mayores a |0,5| se muestran marcados en negrita.

Se asignó una puntuación a cada región de cada animal para cada uno de los factores, cuya representación gráfica permite diferenciar las 4 regiones, siendo la PFC y el hipocampo las que tienen el patrón de NT más parecido (figura 18).

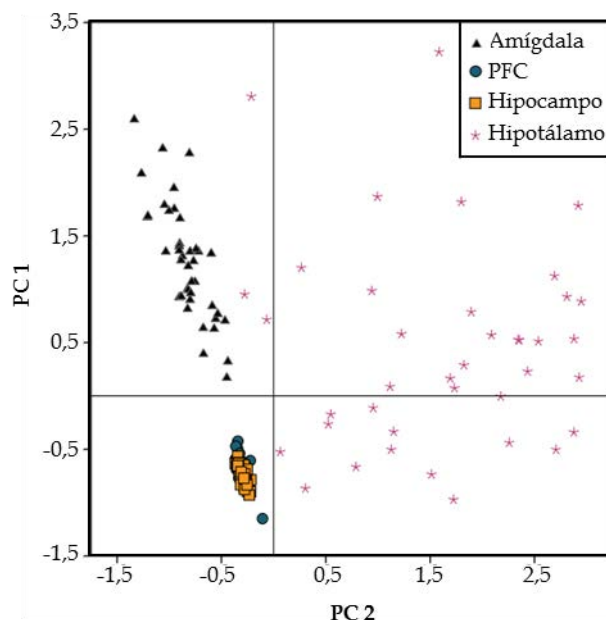


Figura 17. Representación gráfica de las puntuaciones otorgadas a cada región de cada animal para los dos factores extraídos en el PCA.

#### 4.2. Influencia del sexo y genotipo halotano en los niveles de NT

Se compararon los niveles de los metabolitos de las vías catecolaminérgica y serotoninérgica entre genotipo halotano, sexo y la interacción entre ambos factores mediante el análisis de la varianza (UNIANOVA). En la Tabla 10 se muestran los resultados de las concentraciones y de los efectos del análisis estadístico.

Tabla 10. Concentración de NT y sus metabolitos, y P valores en el primer experimento. CAT<sub>total</sub> e IND<sub>total</sub> representa el valor total de cada una de las vías. Representado como media ± SE en los 4 grupos experimentales (n=48).

Parámetro (ng/g tejido)	Genotipo Halotano	Sexo		P valores			
		Macho	Hembra	Sexo	Genotipo	S*G	
Amígdala	NA	NN	237,41 ± 26,02	207,78 ± 19,07	0,083	0,067	0,954
		Nn	200,12 ± 12,39	171,87 ± 5,21			
	DA	NN	513,56 ± 56,62	471,12 ± 60,80	0,722	0,194	0,526
		Nn	402,21 ± 40,15	411,69 ± 28,52			
	DOPAC	NN	84,07 ± 8,00	110,22 ± 12,28	0,128	0,392	0,359
		Nn	81,85 ± 4,23	88,80 ± 7,23			
	HVA	NN	340,34 ± 26,09	385,64 ± 36,56	0,617	0,973	0,069
		Nn	391,76 ± 32,05	320,60 ± 14,03			
	CAT <sub>total</sub>	NN	937,96 ± 83,58	966,98 ± 103,09	0,789	0,328	0,690
		Nn	875,82 ± 70,39	821,09 ± 46,70			
5-HT	NN	1069,59 ± 136,87	1127,93 ± 94,21	0,929	0,327	0,272	

		<i>Nn</i>	1223,77 ± 90,00	1096,72 ± 59,82			
	5-HIAA	<i>NN</i>	282,61 ± 21,92	310,79 ± 10,29	0,661	0,071	<b>0,049</b>
		<i>Nn</i>	351,49 ± 20,66	307,68 ± 16,95			
	INDtotal	<i>NN</i>	1352,19 ± 153,23	1438,72 ± 102,09	0,703	0,395	0,248
		<i>Nn</i>	1575,26 ± 106,29	1404,41 ± 71,81			
PFC	NA	<i>NN</i>	160,43 ± 7,59	166,20 ± 9,80	0,491	0,520	0,167
		<i>Nn</i>	166,58 ± 7,54	149,52 ± 7,28			
	DA	<i>NN</i>	21,01 ± 3,71	26,92 ± 9,40	0,967	0,662	0,302
		<i>Nn</i>	24,57 ± 5,24	18,18 ± 2,95			
	DOPAC	<i>NN</i>	12,96 ± 3,12	14,13 ± 3,06	0,771	0,593	0,783
		<i>Nn</i>	13,63 ± 2,06	13,69 ± 2,53			
	HVA	<i>NN</i>	53,29 ± 9,67	66,69 ± 14,43	0,777	0,277	0,633
		<i>Nn</i>	70,26 ± 10,38	62,29 ± 9,16			
	CATtotal	<i>NN</i>	89,90 ± 16,85	113,84 ± 24,97	0,873	0,572	0,659
		<i>Nn</i>	105,90 ± 16,26	99,35 ± 13,69			
	5-HT	<i>NN</i>	335,98 ± 9,82	270,10 ± 25,88	0,065	0,223	0,075
		<i>Nn</i>	325,59 ± 16,53	324,33 ± 14,70			
	5-HIAA	<i>NN</i>	110,73 ± 3,57	101,13 ± 6,81	0,660	0,196	0,422
		<i>Nn</i>	114,58 ± 11,95	117,39 ± 5,71			
	INDtotal	<i>NN</i>	446,70 ± 11,89	371,23 ± 32,17	0,123	0,181	0,108
		<i>Nn</i>	440,16 ± 26,39	441,72 ± 18,39			
Hipocampo	NA	<i>NN</i>	192,62 ± 11,92	175,35 ± 9,86	0,139	0,651	0,963
		<i>Nn</i>	187,04 ± 12,19	170,81 ± 10,33			
	DA	<i>NN</i>	26,25 ± 1,76	26,41 ± 2,02	0,662	0,239	0,716
		<i>Nn</i>	30,27 ± 2,81	27,61 ± 1,40			
	DOPAC	<i>NN</i>	3,71 ± 0,47	3,82 ± 0,47	0,664	0,750	0,534
		<i>Nn</i>	3,89 ± 0,74	3,27 ± 0,57			
	HVA	<i>NN</i>	30,02 ± 2,62	32,13 ± 3,46	0,734	0,944	0,328
		<i>Nn</i>	33,48 ± 3,27	29,13 ± 3,41			
	CATtotal	<i>NN</i>	63,31 ± 2,13	62,37 ± 4,83	0,398	0,841	0,507
		<i>Nn</i>	67,70 ± 6,84	60,02 ± 4,36			
	5-HT	<i>NN</i>	341,90 ± 21,46	320,16 ± 15,11	0,238	0,259	0,924
		<i>Nn</i>	366,40 ± 15,91	340,90 ± 25,03			
	5-HIAA	<i>NN</i>	122,64 ± 4,78	129,29 ± 5,43	0,563	<b>0,016</b>	0,143
		<i>Nn</i>	154,19 ± 8,82	138,47 ± 9,14			
	INDtotal	<i>NN</i>	464,54 ± 24,14	449,46 ± 19,40	0,274	0,098	0,610
		<i>Nn</i>	520,59 ± 22,97	479,37 ± 32,86			
Hipotálamo	NA	<i>NN</i>	2336,54 ± 311,76	2509,68 ± 342,29	0,323	0,703	0,638
		<i>Nn</i>	2054,02 ± 391,08	2539,63 ± 247,19			
	DA	<i>NN</i>	480,63 ± 79,32	691,00 ± 59,47	0,068	0,277	0,689
		<i>Nn</i>	416,21 ± 131,16	552,48 ± 78,70			
	DOPAC	<i>NN</i>	92,06 ± 18,40	112,43 ± 17,00	0,372	0,393	0,804
		<i>Nn</i>	81,19 ± 22,52	92,74 ± 10,54			
	HVA	<i>NN</i>	400,28 ± 46,15	456,58 ± 39,93	0,467	0,386	0,704
		<i>Nn</i>	419,08 ± 85,19	395,43 ± 52,56			
	CATtotal	<i>NN</i>	1209,64 ± 148,80	1585,09 ± 132,59	0,086	0,587	0,858
		<i>Nn</i>	1138,60 ± 277,87	1444,47 ± 168,27			
	5-HT	<i>NN</i>	774,90 ± 97,73	756,21 ± 62,87	0,910	0,338	0,972
		<i>Nn</i>	720,38 ± 139,60	702,77 ± 92,21			
	5-HIAA	<i>NN</i>	455,29 ± 69,27	505,00 ± 73,36	0,674	0,204	0,724
		<i>Nn</i>	448,21 ± 104,11	388,91 ± 62,69			
	INDtotal	<i>NN</i>	1230,19 ± 149,27	1261,21 ± 98,33	0,779	0,237	0,840
		<i>Nn</i>	1168,58 ± 230,33	1091,67 ± 148,76			

Debido a las pocas diferencias obtenidas para el sexo y el genotipo, y con el objetivo de poder identificar un perfil explicativo de la varianza entre los grupos del estudio, se realizó el análisis multivariante descrito a continuación.

## 5. Perfil multivariante

En el análisis multivariante se incluyeron variables medidas tanto en suero como en regiones del SNC. Como ya se ha comentado, el objetivo era reducir el número de variables, con el fin de identificar factores comunes que pudieran explicar las diferencias entre sexo, genotipo halotano y/o su interacción. Para ello se realizó un PCA que incluyó 43 variables de las cuales 38 cumplieron los requisitos para entrar en el análisis de componentes principales. Quedaron fuera del análisis la CK, el LDL-colesterol, la Pig-MAP, el cortisol y la DA de la PFC.

El PCA resultó en 7 factores que explicaron el 74,29 % de la varianza. Los autovalores, los porcentajes individuales y acumulados y los factores de carga para cada variable, con aquellos mayores a 0,50 se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Resumen del análisis factorial completo del primer experimento. En la parte superior se muestran los autovalores y los porcentajes individuales y acumulados para cada factor extraído. A continuación los *P* valores (en negrita  $P < 0,05$ ) resultantes del análisis estadístico univariante de las puntuaciones otorgadas a cada animal (ver la siguiente tabla). Finalmente, los factores de carga para cada variable, con aquellos mayores a  $|0,5|$  resaltados en negrita. *CATtotal* e *INDtotal* representan el valor total de cada una de las vías.

Componente		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
Autovalores		6,760	6,019	4,507	3,325	2,911	2,505	2,203
Proporción individual		16,886	12,334	10,750	9,722	9,294	8,409	6,897
Proporción acumulada		16,886	29,221	39,970	49,692	58,986	67,395	74,292
Estadísticos (P valores)								
Genotipo		0,255	<b>0,032</b>	0,391	0,090	0,902	<b>0,025</b>	0,131
Sexo		0,471	0,154	0,205	0,249	0,882	0,168	<b>0,014</b>
Genotipo * Sexo		0,997	0,992	0,254	0,823	0,177	<b>0,018</b>	0,717
Variables								
Suero	Glucosa	0,050	-0,024	-0,288	-0,100	0,361	0,216	<b>0,563</b>
	Triglicéridos	0,122	0,180	0,084	0,122	-0,056	0,122	<b>0,723</b>
	Colesterol	-0,072	-0,110	0,140	0,081	-0,239	-0,128	<b>0,558</b>
	HDL-colesterol	0,017	-0,153	0,016	-0,010	-0,186	-0,204	<b>0,673</b>
	3-Hidroxibutirato	0,164	0,040	0,114	-0,044	-0,018	-0,141	<b>0,646</b>
	HP	0,090	<b>-0,616</b>	-0,082	-0,016	-0,204	0,184	-0,032
	CRP	-0,047	<b>-0,577</b>	-0,167	0,061	0,015	0,430	0,226
Amígdala	NA	-0,050	<b>0,696</b>	0,161	-0,111	-0,203	0,113	-0,227
	DOPAC	-0,106	<b>0,725</b>	-0,109	-0,140	0,135	0,469	0,074
	DA	-0,068	<b>0,874</b>	0,131	0,077	-0,039	0,157	-0,029
	HVA	-0,016	<b>0,729</b>	-0,124	0,199	0,345	0,281	0,204
	<i>CATtotal</i>	-0,053	<b>0,905</b>	0,002	0,117	0,113	0,242	0,078

	5-HIAA	0,184	0,182	0,097	0,174	0,091	<b>0,821</b>	0,032
	5-HT	-0,053	0,241	0,198	-0,086	-0,136	<b>0,816</b>	-0,230
	INDtotal	-0,004	0,273	0,184	-0,075	-0,103	<b>0,825</b>	-0,214
Hipocampo	NA	-0,214	0,244	0,065	<b>0,686</b>	-0,024	-0,263	-0,041
	DOPAC	0,114	-0,015	0,229	0,104	<b>0,849</b>	-0,083	-0,090
	DA	0,091	-0,341	0,045	0,462	<b>0,619</b>	-0,191	-0,077
	HVA	0,110	0,228	0,038	0,014	<b>0,780</b>	0,089	-0,108
	CATtotal	0,149	0,035	0,063	0,178	<b>0,890</b>	-0,036	-0,141
	5-HIAA	0,144	-0,021	0,048	<b>0,842</b>	0,288	0,141	0,226
	5-HT	-0,061	0,016	0,090	<b>0,880</b>	0,032	0,028	-0,052
	INDtotal	-0,003	0,005	0,085	<b>0,928</b>	0,117	0,077	0,027
Hipotálamo	NA	<b>0,705</b>	0,031	-0,018	0,084	-0,138	-0,260	0,208
	DOPAC	<b>0,769</b>	0,075	-0,049	-0,267	0,000	0,156	-0,049
	DA	<b>0,908</b>	-0,041	-0,002	0,045	0,132	0,021	0,014
	HVA	<b>0,937</b>	-0,077	-0,026	0,054	0,113	0,047	0,038
	CATtotal	<b>0,922</b>	-0,079	-0,004	0,075	0,054	0,017	0,080
	5-HIAA	<b>0,869</b>	0,038	-0,033	-0,128	0,119	0,162	-0,008
	5-HT	<b>0,855</b>	-0,140	0,113	0,068	0,049	-0,097	0,050
	INDtotal	<b>0,921</b>	-0,073	0,055	-0,049	0,086	0,011	0,026
PFC	NA	0,052	<b>0,533</b>	-0,062	0,086	-0,284	0,202	-0,012
	DOPAC	-0,107	-0,054	<b>0,811</b>	-0,140	0,302	0,059	0,226
	HVA	-0,165	-0,057	<b>0,795</b>	-0,185	0,331	0,195	0,164
	CATtotal	-0,132	0,170	<b>0,728</b>	-0,079	0,201	0,219	0,206
	5-HIAA	0,338	0,082	<b>0,662</b>	0,334	-0,021	0,101	0,124
	5-HT	0,057	0,072	<b>0,835</b>	0,261	-0,139	-0,052	-0,187
	INDtotal	0,149	0,080	<b>0,844</b>	0,303	-0,113	-0,008	-0,105

Del PCA se consideran variables explicativas aquellas con factores de carga mayores a  $|0,5|$ , por lo que se considera:

- El **Factor 1** (monoaminas en el hipotálamo) explicó el 16,89% del total de la varianza. Los animales con una puntuación elevada para el factor 1 tenían altos niveles de catecolaminas e indolaminas en el hipotálamo.
- El **Factor 2** (catecolaminas en la amígdala, NA en PFC y proteínas de fase aguda) explicaron el 12,34% de la varianza total. Los animales con puntuaciones altas para este factor mostraron elevados niveles de catecolaminas en la amígdala, NA en la PFC y bajos niveles de Hp y CRP en el suero.
- El **Factor 3** (sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en PFC) explicó el 10,75% de la varianza. Los animales con alta puntuación para el factor 3 tuvieron altos niveles de DA y 5-HT, así como de sus metabolitos en la PFC.
- El **Factor 4** (sistemas noradrenérgico y serotoninérgico en el hipocampo) explicó el 9,72% de la varianza total. Los animales con una puntuación alta para este factor mostraron altos niveles de NA e indolaminas en el hipocampo.

- El **Factor 5** (sistema dopaminérgico en el hipocampo) explicó el 9,29% de la varianza total. Los animales con una puntuación elevada para este factor mostraron altos niveles de DA y sus metabolitos en el hipocampo.
- El **Factor 6** (sistema serotoninérgico en la amígdala) explicó el 8,4% de la varianza total. Los animales con altas puntuaciones para el factor 6 tuvieron altos niveles de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en la amígdala.
- El **Factor 7** (metabolismo de lípidos y carbohidratos) explicó el 6,9% de la varianza total. Los animales con alta puntuación para este factor tuvieron altos niveles de glucosa, triglicéridos, 3-hidroxiacetil-CoA, colesterol y HDL-colesterol.

El análisis otorgó una puntuación a cada animal para cada factor. Esta puntuación es la combinación lineal de las variables medidas en el individuo aplicando el factor de carga establecido para cada una de ellas por el PCA, está distribuida normalmente y con la media en el 0.

Se analizaron las diferencias entre estas puntuaciones según los efectos del estudio (sexo y genotipo halotano) mediante el análisis de la varianza (UNIANOVA). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Resumen de las diferencias en los factores del PCA para el primer estudio. P valores de los efectos del genotipo, el sexo y su interacción.

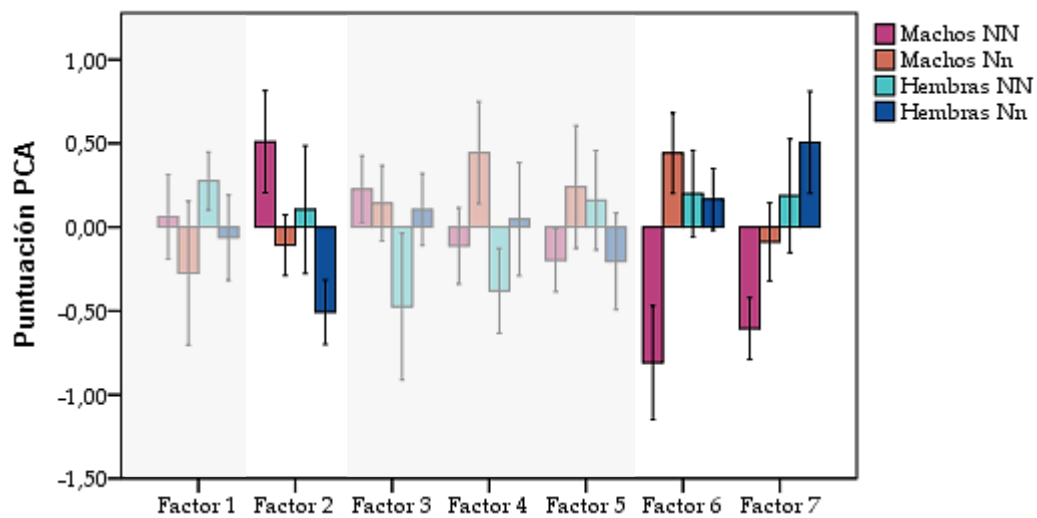
FACTOR	Variables explicativas	Estadísticos (P valores)		
		Genotipo	Sexo	Genotipo * Sexo
Factor 1	NA, DA Y 5-HT hipotálamo	0,255	0,471	0,997
Factor 2	NA y DA amígdala, NA PFC,APP	<b>0,032</b>	0,154	0,992
Factor 3	DA Y 5-HT PFC	0,391	0,205	0,254
Factor 4	NA y 5-HT hipocampo	0,090	0,249	0,823
Factor 5	DA hipocampo	0,902	0,882	0,177
Factor 6	5-HT amígdala	<b>0,025</b>	0,168	<b>0,018</b>
Factor 7	Metabolismo energético	0,131	<b>0,014</b>	0,717

El distinto genotipo se caracterizó por diferencias en el factor 2 (catecolaminas en amígdala y APP en suero) y en el factor 6 (indolaminas en amígdala). Como se observa en la figura 19, los animales Nn tienen puntuaciones menores para el factor 2, indicando que tienen niveles menores de catecolaminas en la amígdala, menor nivel de NA en PFC, así como una concentración sérica más alta de las APP CRP y Hp que los animales NN.

La variable sexo se caracterizó por diferencias en el factor 7, que incluye parámetros séricos indicadores del metabolismo energético. Como se observa en la figura 19, las hembras tienen

mayores puntuaciones para este factor lo que indica concentraciones mayores de estos metabolitos en hembras que en machos, tal y como ya indicaba el análisis univariante.

Se observó una interacción sexo\*genotipo en el factor 6 (indolaminas en la amígdala). En el análisis univariante de los factores se observa que existen diferencias en este factor causadas por el genotipo, pero la interacción señala distinta tendencia entre sexos. Observando el gráfico de la figura 19 se concluye que los animales Nn tuvieron puntuaciones más bajas para este factor, pero esta diferencia se observa más acentuada en los machos, sugiriendo bajas concentraciones de serotonina en la amígdala de estos animales.



**Figura 18.** Representación gráfica de las puntuaciones otorgadas en el PCA a cada individuo para cada factor en el primer estudio. Las 4 barras representan a los 4 grupos de estudio creados de la interacción sexo\*genotipo: machos NN, machos Nn, hembras NN y hembras Nn. En sombreado los factores para los cuales no hay ninguna diferencia entre grupos. Las barras representan la media  $\pm$  SE.





## CAPÍTULO 2

# CONDUCTA DEL MIEDO Y ESTRÉS

El test de inmovilidad tónica (TI) es un test establecido para evaluar la respuesta al miedo en vertebrados (Leite-Panissi, Ferrarese, Terzian, & Menescal-de-Oliveira, 2006). Largas duraciones en el TI están consideradas como un indicador de altos niveles de miedo, de manera que se asocia esta inmovilidad con componentes emocionales como el miedo o la ansiedad (De Oliveira, Hoffmann, & Menescal-de-Oliveira, 1997) o con un fenotipo miedoso en general (Wang et al., 2014).

En cerdos, el TI ha demostrado ser consistente con otros test de comportamientos realizados a diferentes edades evaluando el miedo, la agresividad y estrategias conductuales frente a situaciones estresantes. También se ha relacionado el TI con variables de la calidad de la carne y con el origen genético (de Sevilla, Casellas, Tibau, & Fàbrega, 2009; Erhard & Mendl, 1999).

La respuesta al miedo ha sido ampliamente vinculada con la respuesta al estrés, al estar ambas reguladas por el eje HPA (Hashimoto, Inoue, & Koyama, 1999). En los sistemas de producción porcinos, los animales son sometidos a gran número de factores de estrés, como el manejo, la mezcla, el transporte o el sacrificio, que pueden comportar una pérdida de bienestar animal y/o costes económicos (Gispert et al., 2000; Grandin, 1997).

## 1. Test de inmovilidad tónica

Este test fue llevado a cabo por investigadores del IRTA en sus instalaciones. Los animales fueron sometidos al test de TI adaptado de Erhard y Mendl 1999 y de Sevilla et al. 2009. El experimentador sujetaba individualmente cada lechón en posición de decúbito dorsal usando una restricción de madera en forma de V (50 cm de longitud y ángulo de 80°). Mientras, otro experimentador situaba un pequeño saco (15 cm x 20 cm, 500 g) sobre la garganta del lechón con un mano, y con la otra sujetaba las patas traseras hasta que el animal quedaba inmóvil. El tiempo transcurrido entre que el experimentador retiraba las manos de las patas traseras y el animal trataba de darse la vuelta era registrado. Si el animal no intentaba girarse en 180 s, el ensayo finalizaba y se le asignaba una puntuación de 180 s (TI positivo, *TIpos*). Por otro lado, a los lechones que no mostraron respuesta de inmovilidad porque luchaban mientras se les intentaba colocar en la restricción de madera, se les asignó una puntuación de 0 s (TI negativo, *TIneg*).

De los 92 lechones a los que se les realizó el test, 5 no mostraron respuesta de inmovilidad y fueron clasificados como *TIneg*, y otros 3 animales no intentaron girarse durante los 3 min de duración del test y fueron clasificados como *TIpos*. La media del tiempo que tardaban en intentarse girar de los 92 lechones fue de  $34,80 \pm 3,77$  s. Para conseguir un tamaño muestral suficiente, los 18 individuos con el comportamiento más extremo fueron elegidos, de manera que se seleccionaron y clasificaron como *TIneg* los 18 con los tiempos más bajos (menor o igual a 10 s, media de tiempo  $5,00 \pm 0,93$ ) y como *TIpos* los 18 con los tiempos más altos (igual o mayor que 54 s, media de tiempo  $93,05 \pm 10,22$  s). En la figura 17 se muestra el esquema del diseño experimental, que incluye la selección de animales.

Debido a que una duración larga del TI es considerada un indicador de alto nivel de miedo, los animales positivos para el TI fueron clasificados como miedosos y los negativos como no miedosos.

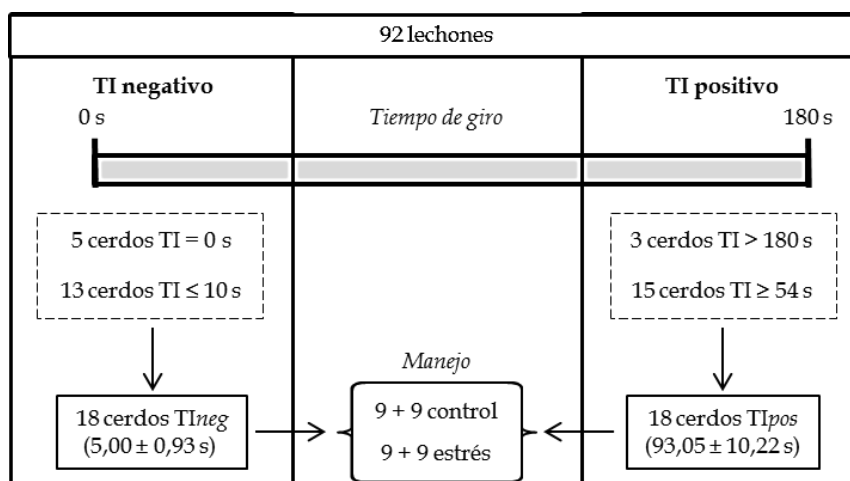
## 2. Diseño experimental

En este estudio se utilizaron 92 lechones macho procedentes del cruce de hembras Large White x Landrace libres para el gen halotano (RYR1; NN) con machos Pietrain heterocigotos para el gen halotano (Nn) de la misma granja comercial. A la edad de 3 semanas fueron alojados en 10 grupos de 10-12 lechones en las naves de pre-control, donde, con 4 semanas de edad, fueron sometidos al test TI. Se seleccionaron 36 animales, 18 positivos para el TI (grupo *TIpos*) y 18 negativos (grupo *TIneg*) según lo descrito en el apartado anterior, que a las 8 semanas de edad fueron trasladados a la nave experimental donde se estabularon en 4 corrales de nueve animales cada uno (2 corrales para cada grupo de TI). Todos los grupos se instalaron en corrales con *slat* total (5 m x 2,70 m) con luz natural

y temperatura ambiental de  $22 \pm 3$  °C, bebederos de acero (15 cm x 16 cm) conectados con chupete de acero y un comedero de hormigón (58 cm x 34 cm) con 4 posiciones de alimentación, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Fueron examinados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

A la edad de 24 semanas los animales fueron mantenidos 8 h en ayuno antes de ser transportados de la granja al matadero experimental (1,2 km de distancia). Se sometió a los animales a dos condiciones diferenciadas en el manejo durante la descarga, espera y conducción al área de aturdimiento: un manejo control (grupo Control) realizado sobre los animales de dos de los corrales de alojamiento (9 animales T<sub>neg</sub> y 9 T<sub>pos</sub>) y otro manejo estrés (grupo Estrés) sobre los animales de los otros dos corrales (9 animales T<sub>neg</sub> y 9 T<sub>pos</sub>) (figura 20). Durante la carga, descarga y conducción al área de aturdimiento, los animales del grupo estrés fueron sometidos a una situación similar a la sufrida en un matadero comercial (ruido, presencia humana y manejo tosco) y fueron mezclados entre los dos corrales iniciales durante la hora en que los animales fueron alojados en los corrales de espera. Los animales de los otros dos corrales (9 T<sub>neg</sub> y 9 T<sub>pos</sub>) fueron manejados de manera tranquila, sin forzarlos en sus movimientos y cediéndoles el tiempo necesario para proceder por ellos mismos y fueron mantenidos en sus grupos de estabulación en granja mientras estaban en el corral de espera. La duración total de este manejo diferenciado fue de unos 90 min. Los animales fueron aturridos por parejas mediante exposición durante 3 min a 90 % de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico y posteriormente desangrados. La muestra de suero se obtuvo en este momento, y las de las regiones cerebrales posteriormente.

Los parámetros bioquímicos y los NT cerebrales se determinaron tal como se especifica en Materiales y Métodos.



**Figura 19.** Diagrama explicativo de los animales y condiciones del segundo estudio. De los 92 lechones iniciales se seleccionaron los 18 con comportamientos más extremos. Nueve animales de cada clasificación para el TI fueron sometidos a un manejo estresante en el matadero y el resto, otros 9 animales de cada clasificación TI fueron tratados de manera calmada.

### 3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el *software* Statistical Analyses System (SAS v9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El nivel de significancia fue establecido en  $P < 0,05$  y la tendencia fue considerada en  $0,05 \leq P \leq 0,1$ . Los datos descriptivos son presentados con la media y el SE (media  $\pm$  SE).

Se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a logaritmo para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

#### 3.1. Estadística univariante

Las variables normalmente distribuidas fueron analizadas usando el método MIXED de SAS con ajuste de Tukey. Las variables con distribución Poisson o multinomial fueron analizadas utilizando el método GENMOD de SAS. En todos los modelos, cada animal fue introducido como la unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron el tipo de manejo (control o estrés) y el resultado del test de TI (*TIneg* o *TIpos*). Para establecer las diferencias entre los animales *TIneg* y *TIpos* en los diferentes manejos, se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni.

### 4. Perfil bioquímico

Se determinaron los niveles de CK como marcador de daño muscular; de glucosa, triglicéridos y colesterol como marcadores del metabolismo energético; de la APP Hp y de cortisol en suero. Los resultados obtenidos, así como el *P* valor del análisis estadístico se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el segundo estudio según el manejo expresados como media  $\pm$  SE y el *P* valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos ( $n = 36$ ).

Parámetro	Manejo		<i>P</i> valor
	Control	Estrés	
CK (U/mL)	4,23 $\pm$ 0,73	4,78 $\pm$ 0,71	0,409
Glucosa (mg/dL)	261,54 $\pm$ 23,09	282,46 $\pm$ 19,09	0,490
Triglicéridos (mg/dL)	62 $\pm$ 4,89	57,72 $\pm$ 3,52	0,483
Colesterol (mg/dL)	107,04 $\pm$ 3,71	100,66 $\pm$ 3,22	0,203
Hp (mg/mL)	0,27 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,04	0,990
Cortisol (ng/mL)	40,49 $\pm$ 4,56	37,25 $\pm$ 3,44	0,574

El análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa entre el grupo sometido a estrés por manejo y el control.

Posteriormente se realizó la comparación por pares de Bonferroni para establecer si los animales con un fenotipo miedoso o no, afrontaban de manera diferencial el estrés por manejo. Las medias, SE y *P* valores se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el segundo estudio según el TI para cada manejo (media  $\pm$  SE)

Parámetro	Manejo Control		<i>P</i> valor	Manejo Estrés		<i>P</i> valor
	TIneg	TIpós		TIneg	TIpós	
CK (U/mL)	5,36 $\pm$ 1,23	3,09 $\pm$ 0,66	0,063	4,91 $\pm$ 1,07	4,62 $\pm$ 0,96	0,849
Glucosa (mg/dL)	244,16 $\pm$ 25,27	278,93 $\pm$ 39,4	0,426	290,78 $\pm$ 23,61	274,13 $\pm$ 31,21	0,702
Triglicéridos (mg/dL)	58,22 $\pm$ 5,9	65,78 $\pm$ 7,95	0,391	57,56 $\pm$ 4,78	57,89 $\pm$ 5,47	0,970
Colesterol (mg/dL)	109,04 $\pm$ 4,83	105,04 $\pm$ 5,84	0,579	100,32 $\pm$ 5,68	100,99 $\pm$ 3,46	0,926
Hp (mg/mL)	0,26 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,07	0,779	0,29 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,06	0,781
Cortisol (ng/mL)	45,77 $\pm$ 6,74	35,21 $\pm$ 6	0,169	28,48 $\pm$ 3,69	46,02 $\pm$ 4,16	<b>0,026</b>

*P* valor < 0,05 marcado en negrita (n=36).

En el manejo estresante los animales TIpós (miedosos) mostraron mayor nivel de **cortisol** que los TIneg (no miedosos). Sin embargo, en el manejo control no hubo diferencias significativas.

## 5. Perfil de NT

Se determinaron las concentraciones de NT monoaminérgicos de las vías de las catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, DOPAC y HVA, y 5-HIAA, respectivamente) en amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo. Como valores totales de cada uno de los tipos de NT monoaminérgicos, se realizó la suma de todas las moléculas involucrada en la vía de las catecolaminas (CAT<sub>total</sub>) y de las indolaminas (IND<sub>total</sub>).

Se compararon las concentraciones de las monoaminas en las regiones anteriormente descritas entre los dos grupos de manejo, el estrés y el control.

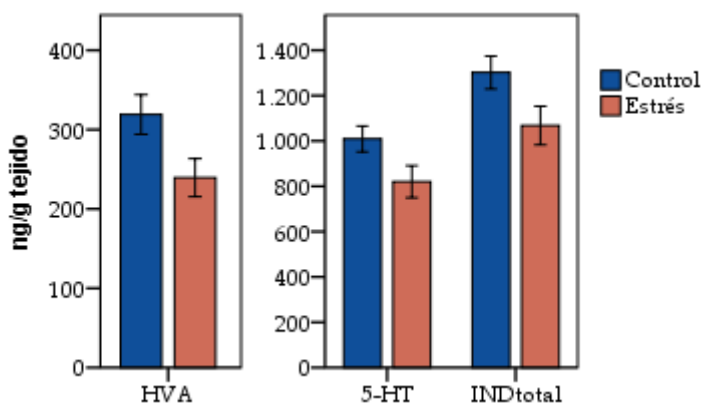
A continuación se presentan las concentraciones de los NT y sus metabolitos por regiones analizadas en el estudio (Tablas 15-18).

El grupo de animales sometidos a estrés por manejo presentó concentraciones significativamente menores de 5-HT (*P* = 0,044), HVA (*P* = 0,028) y una tendencia para la DA en la **amígdala**. Como consecuencia también se observó la disminución del contenido total de indolaminas en esta área (*P* = 0,043).

**Tabla 15.** Concentración de NT y sus metabolitos en la amígdala en el segundo estudio según el manejo en el matadero: manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) expresado como media  $\pm$  SE y el *P* valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos.

Parámetro (ng/g tejido)	Amígdala		<i>P</i> valor
	Manejo		
	Control	Estrés	
NA	146,79 $\pm$ 9,02	158,55 $\pm$ 16,98	0,803
DA	403,52 $\pm$ 32,34	313,27 $\pm$ 34,20	0,064
DOPAC	47,38 $\pm$ 5,79	39,17 $\pm$ 5,54	0,319
HVA	318,94 $\pm$ 24,92	239,32 $\pm$ 24,02	<b>0,028</b>
CAT <sub>total</sub>	916,63 $\pm$ 61,81	793,1 $\pm$ 47,24	0,134
5-HT	1009,16 $\pm$ 57,02	820,20 $\pm$ 70,74	<b>0,044</b>
5-HIAA	292,67 $\pm$ 18,31	248,00 $\pm$ 17,99	0,092
IND <sub>total</sub>	1301,84 $\pm$ 72,43	1068,2 $\pm$ 84,90	<b>0,043</b>

*P* valor < 0,05 marcado en negrita (n = 36).



**Figura 20.** Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en la amígdala para el segundo estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

En la PFC no se encontró ninguna diferencia significativa en los niveles de ninguna monoamina ni de sus metabolitos.

**Tabla 16.** Concentración de NT y sus metabolitos en la PFC en el segundo estudio según el manejo en el matadero: manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) expresado como media  $\pm$  SE y el *P* valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos. *P* valor  $< 0,05$  marcado en negrita ( $n = 36$ ).

Parámetro (ng/g tejido)	PFC		<i>P</i> valor
	Manejo		
	Control	Estrés	
NA	139,11 $\pm$ 5,77	150,80 $\pm$ 5,10	0,149
DA	19,80 $\pm$ 2,09	20,13 $\pm$ 1,50	0,903
DOPAC	7,61 $\pm$ 1,24	6,87 $\pm$ 1,21	0,83
HVA	61,7 $\pm$ 7,95	61,18 $\pm$ 5,94	0,821
CAT <sub>total</sub>	227,58 $\pm$ 14,36	239,94 $\pm$ 18,22	0,595
5-HT	255,24 $\pm$ 15,10	250,03 $\pm$ 15,89	0,835
5-HIAA	107,83 $\pm$ 6,38	114,57 $\pm$ 8,33	0,418
IND <sub>total</sub>	363,07 $\pm$ 20,01	364,6 $\pm$ 22,18	0,964

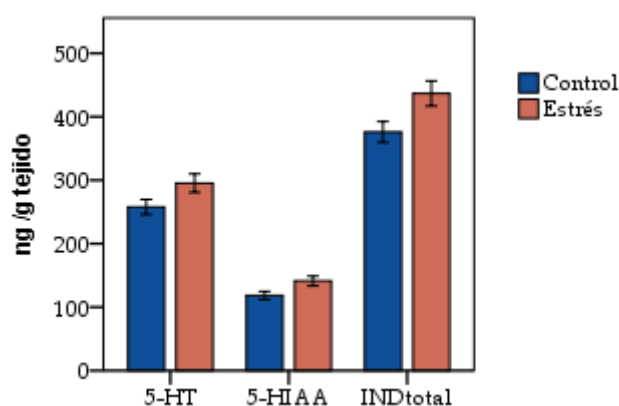
*P* valor  $< 0,05$  marcado en negrita ( $n = 36$ ).

En el **hipocampo**, la concentración de 5-HIAA ( $P = 0,031$ ), 5-HT ( $P = 0,054$ , tendencia) e indolaminas totales ( $P = 0,024$ ) era superior en los animales sometidos a estrés por manejo.

**Tabla 17.** Concentración de NT y sus metabolitos en el hipocampo en el segundo estudio según el manejo en el matadero: manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) expresado como media  $\pm$  SE y el *P* valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos.

Parámetro (ng/g tejido)	Hipocampo		<i>P</i> valor
	Manejo		
	Control	Estrés	
NA	134,21 $\pm$ 5,84	126,75 $\pm$ 8,27	0,467
DA	28,86 $\pm$ 4,19	26,18 $\pm$ 3,29	0,619
CAT <sub>total</sub>	157,71 $\pm$ 6,67	151,68 $\pm$ 8,65	0,846
5-HT	257,78 $\pm$ 11,78	295,35 $\pm$ 14,68	0,054
5-HIAA	118,24 $\pm$ 6,64	141,23 $\pm$ 7,76	<b>0,031</b>
IND <sub>total</sub>	376,02 $\pm$ 16,35	436,58 $\pm$ 19,67	<b>0,024</b>

*P* valor  $< 0,05$  marcado en negrita ( $n = 36$ ).



**Figura 21.** Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en la PFC para el segundo estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

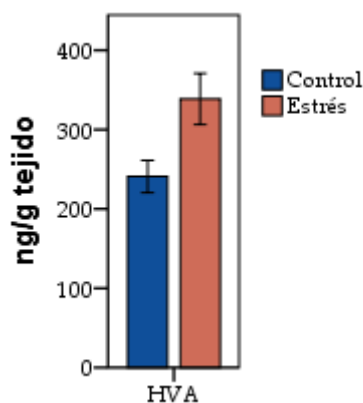


En el **hipotálamo** se observó un incremento de HVA ( $P = 0,017$ ) en los animales sometidos a estrés en el sacrificio.

**Tabla 18.** Concentración de NT y sus metabolitos en el hipotálamo en el segundo estudio según el manejo en el matadero: manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) expresado como media  $\pm$  SE y el  $P$  valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos.

Hipotálamo			
Parámetro (ng/g tejido)	Manejo		$P$ valor
	Control	Estrés	
NA	2116,99 $\pm$ 135,36	1913,08 $\pm$ 101,48	0,232
L-DOPA	308,07 $\pm$ 25,13	311,92 $\pm$ 29,23	0,921
DA	293,1 $\pm$ 23,93	310,12 $\pm$ 19,58	0,583
DOPAC	65,41 $\pm$ 14,49	55,89 $\pm$ 8,00	0,539
HVA	240,94 $\pm$ 20,37	338,56 $\pm$ 32,17	<b>0,017</b>
CAT <sub>total</sub>	2977,17 $\pm$ 177,41	2854,74 $\pm$ 122,88	0,567
5-HT	967,30 $\pm$ 71,29	1018,00 $\pm$ 75,43	0,636
5-HIAA	352,19 $\pm$ 27,54	390,07 $\pm$ 35,51	0,426
IND <sub>total</sub>	1319,50 $\pm$ 92,95	1408,07 $\pm$ 105,42	0,545

$P$  valor  $<$  0,05 marcado en negrita ( $n = 36$ ).



**Figura 22.** Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo en los NT en el hipotálamo para el segundo estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

### 5.1. Influencia del fenotipo miedoso frente a un manejo estresante

Para establecer si los animales clasificados como miedosos (*TiPos*) mostraban mayor respuesta al manejo estresante en el matadero, se realizaron comparaciones por pares dentro del mismo grupo de manejo. Las medias para cada uno de los grupos y los  $P$  valores de la comparación entre el fenotipo miedoso o no dentro de cada tipo de manejo son mostradas en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Concentración de NT y sus metabolitos en la amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo tras un manejo control (Control) y un manejo estresante (Estrés) y según la clasificación individual para el test TI (T<sub>neg</sub> o T<sub>pos</sub>). Expresado como media  $\pm$  SE.

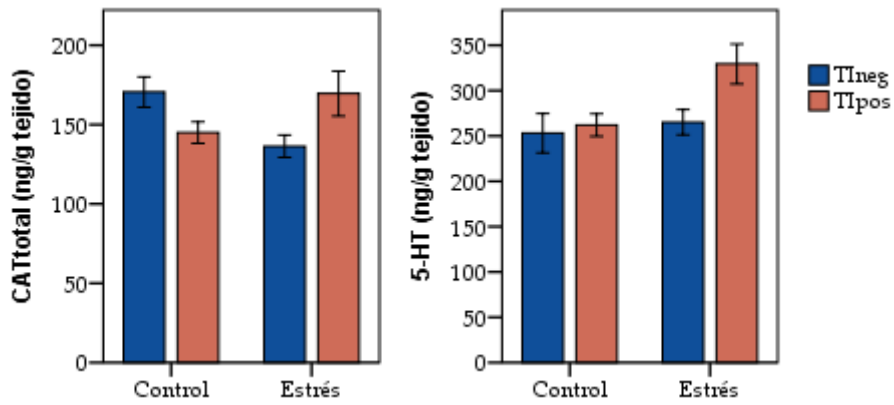
Parámetro (ng/g tejido)	Manejo Control		P valor	Manejo Estrés		P valor	
	T <sub>neg</sub>	T <sub>pos</sub>		T <sub>neg</sub>	T <sub>pos</sub>		
Amígdala	NA	151,73 $\pm$ 13,41	141,85 $\pm$ 12,65	1,000	166,48 $\pm$ 24,28	149,63 $\pm$ 20,54	1,000
	DA	407,38 $\pm$ 59,12	399,67 $\pm$ 30,76	1,000	278,69 $\pm$ 46,24	352,17 $\pm$ 50,24	0,583
	DOPAC	45,62 $\pm$ 10	49,15 $\pm$ 6,43	1,000	37,47 $\pm$ 7,18	40,66 $\pm$ 8,71	1,000
	HVA	280,28 $\pm$ 32,11	357,6 $\pm$ 35,13	0,231	229,5 $\pm$ 40,92	250,36 $\pm$ 24,83	1,000
	CAT <sub>total</sub>	884,99 $\pm$ 104,02	948,27 $\pm$ 71,88	1,000	793,44 $\pm$ 70,7	792,81 $\pm$ 67,97	1,000
	5-HT	1016,53 $\pm$ 73,68	1001,79 $\pm$ 91,51	1,000	762,88 $\pm$ 100,06	884,68 $\pm$ 101,56	0,728
	5-HIAA	311,48 $\pm$ 29,19	273,86 $\pm$ 22,02	0,615	241,95 $\pm$ 29,51	254,81 $\pm$ 20,97	1,000
	IND <sub>total</sub>	1328,02 $\pm$ 98,5	1275,65 $\pm$ 111,46	1,000	1004,83 $\pm$ 125	1139,49 $\pm$ 116,39	0,829
PFC	NA	131,26 $\pm$ 8,89	146,1 $\pm$ 7,18	0,346	150,22 $\pm$ 5,17	151,38 $\pm$ 9,26	1,000
	DA	16,17 $\pm$ 2,69	23,03 $\pm$ 2,85	0,119	20,46 $\pm$ 2,71	19,8 $\pm$ 1,52	1,000
	DOPAC	8,46 $\pm$ 1,85	6,86 $\pm$ 1,74	0,737	7,15 $\pm$ 1,91	6,59 $\pm$ 1,65	1,000
	HVA	58,54 $\pm$ 9,99	64,51 $\pm$ 12,6	1,000	58,17 $\pm$ 10,83	64,2 $\pm$ 5,62	0,873
	CAT <sub>total</sub>	213,36 $\pm$ 22,07	241,8 $\pm$ 18,42	0,691	225,83 $\pm$ 32,16	256,86 $\pm$ 11,94	0,789
	5-HT	258,26 $\pm$ 12,71	252,56 $\pm$ 27,08	1,000	228,96 $\pm$ 26,73	271,1 $\pm$ 15,52	0,448
	5-HIAA	117,41 $\pm$ 8,88	99,31 $\pm$ 8,55	0,427	104,91 $\pm$ 12,03	124,24 $\pm$ 11,24	0,394
	IND <sub>total</sub>	375,67 $\pm$ 19,43	351,87 $\pm$ 34,44	1,000	326,83 $\pm$ 31,21	413,17 $\pm$ 21,05	0,392
Hipocampo	NA	140,31 $\pm$ 7,64	128,79 $\pm$ 8,71	0,874	123,84 $\pm$ 11,01	130,03 $\pm$ 13,16	1,000
	DA	33,01 $\pm$ 6,68	24,72 $\pm$ 5,09	0,566	23,31 $\pm$ 4,61	30,00 $\pm$ 4,57	0,777
	CAT <sub>total</sub>	170,51 $\pm$ 9,61	144,92 $\pm$ 6,80	0,128	136,35 $\pm$ 7,05	169,56 $\pm$ 14,17	<b>0,047</b>
	5-HT	253,05 $\pm$ 21,67	261,98 $\pm$ 12,42	1,000	265,13 $\pm$ 13,90	329,35 $\pm$ 22,04	<b>0,030</b>
	5-HIAA	119,86 $\pm$ 10,72	116,81 $\pm$ 8,75	1,000	134,88 $\pm$ 8,42	148,38 $\pm$ 13,70	0,733
	IND <sub>total</sub>	372,91 $\pm$ 30,80	378,79 $\pm$ 16,41	1,000	400,01 $\pm$ 20,11	477,73 $\pm$ 30,03	0,063
Hipotálamo	NA	2011,75 $\pm$ 177,09	2264,34 $\pm$ 213,90	0,613	1724,17 $\pm$ 128,95	2054,75 $\pm$ 133,69	0,303
	L-DOPA	295,22 $\pm$ 37,60	326,05 $\pm$ 32,57	1,000	238,27 $\pm$ 29,48	354,01 $\pm$ 34,31	0,090
	DA	293,43 $\pm$ 41,27	292,63 $\pm$ 14,28	1,000	286,96 $\pm$ 35,20	327,50 $\pm$ 21,95	0,713
	DOPAC	58,26 $\pm$ 16,61	74,94 $\pm$ 28,97	1,000	57,50 $\pm$ 13,78	54,27 $\pm$ 9,52	1,000
	HVA	224,42 $\pm$ 20,66	269,85 $\pm$ 43,28	0,704	397,28 $\pm$ 58,88	294,52 $\pm$ 29,32	0,202
	CAT <sub>total</sub>	2858,10 $\pm$ 254,02	3143,87 $\pm$ 245,6	0,729	2624,76 $\pm$ 72,66	3027,23 $\pm$ 190,60	0,343
	5-HT	906,42 $\pm$ 101,21	1052,53 $\pm$ 94,46	0,714	900,42 $\pm$ 114,09	1120,88 $\pm$ 91,29	0,245
	5-HIAA	327,84 $\pm$ 30,67	386,30 $\pm$ 50,30	0,859	383,88 $\pm$ 47,08	395,49 $\pm$ 55,28	1,000
IND <sub>total</sub>	1234,26 $\pm$ 128,72	1438,83 $\pm$ 126,98	0,710	1284,30 $\pm$ 155,95	1516,37 $\pm$ 140,86	0,476	

P valor < 0,05 marcado en negrita (n = 36).

En la situación **control**, no hubo ninguna diferencia significativa entre los animales T<sub>pos</sub> y T<sub>neg</sub>.

En cambio, en el grupo de animales sometidos a **estrés por manejo** se observaron algunas diferencias entre los grupos T<sub>pos</sub> y T<sub>neg</sub>. Los animales clasificados como miedosos (T<sub>pos</sub>) mostraron mayor contenido total de catecolaminas ( $P = 0,047$ ), 5-HT ( $P = 0,030$ ) y una

tendencia para las indolaminas totales ( $P = 0,063$ ) en el **hipocampo** en comparación con los animales clasificados como no miedosos (TI<sub>neg</sub>). En la figura 21 se representan las medias de las concentraciones para los 4 grupos.



**Figura 23.** Representación gráfica de los efectos significativos del estrés por manejo según la clasificación para el TI en el segundo estudio. Las dos variables corresponden a concentraciones en el hipocampo. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

## CAPÍTULO 3

# ALOJAMIENTO Y ESTRÉS POR TRANSPORTE

El modo en que las condiciones de transporte y alojamiento pueden afectar el bienestar animal en la producción porcina es un tema principal en la investigación. Los efectos conductuales de estas condiciones han sido ampliamente evaluados, sin embargo no lo han sido los efectos biológicos.

La producción porcina en extensivo es una alternativa a los sistemas convencionales y puede mejorar el bienestar animal ya que reduce el estrés crónico normalmente asociado con la producción intensiva (Tozawa et al., 2016). La mayor ventaja en el bienestar de esta producción extensiva es la falta de restricción conductual debido al aumento de espacio, el enriquecimiento ambiental (EE) y la diversidad (Honeyman, 2005; Millet, Moons, Oeckel, et al., 2005). Además, para el consumidor, las pasturas exteriores presentan una mejor imagen debido a la percepción de esta mejora en el bienestar y también en la calidad de la carne (C. Terlouw, Berne, & Astruc, 2009). Aun así, los animales en estas condiciones

también tienen que hacer frente a las inclemencias ambientales como el calor o el frío (Edwards, 2005).

Además, como ya se ha descrito, hay varios estresores reconocidos y estudiados en cerdos, como la recolocación, la mezcla, el transporte o el sacrificio (Terlouw et al. 2008). Un tema importante a estudiar es si los cerdos alojados en diferentes sistemas de cría afrontan y muestran diferente respuesta ante los factores causantes de estrés previos al sacrificio, como la carga y descarga, el transporte o el estabulado en un ambiente novedoso en el matadero (Lebret et al., 2015). Los sistemas de producción animal con posibilidad de pastura en el exterior son considerados situaciones en los que se da cierto enriquecimiento ambiental (EE) (Honeyman, 2005; Millet, Moons, Van Oeckel, & Janssens, 2005). Puesto que algunos estudios sugieren que los cerdos criados en sistemas enriquecidos afrontan mejor y reaccionan menos ante los factores previos al sacrificio que aquellos provenientes de sistemas de producción intensivos (Edwards, 2005; Klont et al., 1999; C. Terlouw et al., 2009), resulta de interés estudiar si la combinación de condiciones de alojamiento intensivas con acceso al exterior confiere una mejora en el bienestar animal y una mejor habilidad para hacer frente al estrés por transporte.

## 1. Diseño experimental

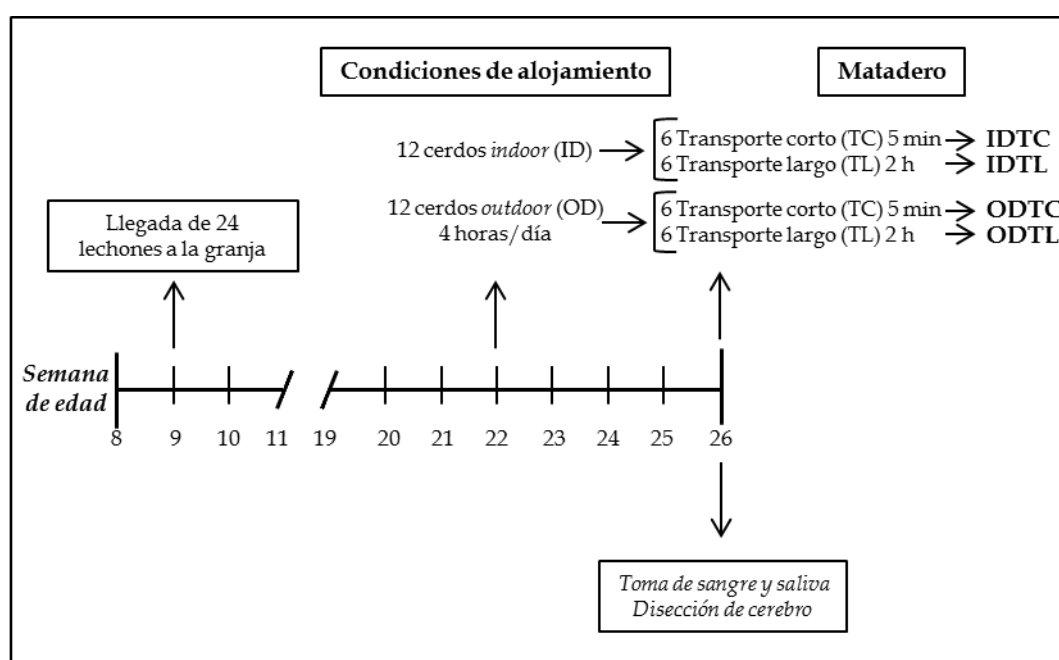
En este estudio se utilizaron 24 lechones hembra procedentes del cruce de cerdas Large White x Landrace libres para el gen halotano (RYR1; NN) con machos Pietrain heterocigotos para el gen halotano (Nn) de la misma granja comercial.

A la edad de 9 semanas fueron trasladados a las instalaciones experimentales del IRTA, donde se estabularon en 1 nave de 4 corrales con seis animales cada una. Todos los grupos se instalaron en corrales con *slat* total (5 m x 2,70 m) con luz natural y temperatura ambiental de  $22 \pm 3$  °C, bebederos de acero (15 cm x 16 cm) conectados con chupete de acero y un comedero de hormigón (58 cm x 34 cm) con 4 posiciones de alimentación, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Fueron examinados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

A las 22 semanas se dividieron los animales en dos grupos. El primero de ellos (n = 12) se mantuvo en las condiciones anteriormente descritas (grupo *indoor*, **ID**). El segundo grupo (n = 12) se estabuló combinando las condiciones de interior con 4 horas (de 9:00 a 13:00) de pasto exterior (grupo *outdoor*, **OD**). En el exterior, los animales pastaban en un cercado de 250 m<sup>2</sup> sin pavimentar combinando barro y hierba complementado con una área cubierta para proteger de la luz solar directa y acceso a bebedero.

A las 26 semanas de edad se sometió a los animales a dos condiciones distintas de sacrificio. Un grupo de 12 animales (6 de cada una de las condiciones de alojamiento) se transportó al matadero realizando un trayecto de 5 min de duración (1,2 km) por una carretera sin curvas (transporte corto, TC). Los 12 animales restantes, de nuevo 6 de cada condición de alojamiento, se transportaron al matadero realizando un trayecto de 2 h por una carretera de montaña con curvas (transporte largo, TL).

A la llegada al matadero, los animales fueron aturdidos en grupos de dos por exposición a 90 % de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico durante 3 min y posteriormente desangrados. El diseño experimental se muestra en la Figura 24.



**Figura 24.** Cronograma de los tratamientos realizados en el capítulo 3. Llegada a la granja experimental a las 9 semanas de edad, inicio del alojamiento 4 horas al día de un grupo (*outdoor*,  $n = 12$ ) a las 22 semanas. A las 26 semanas los animales son trasladados al matadero sufriendo un transporte corto y suave o en un transporte largo y rudo. El diseño conlleva a 4 grupos diferenciales: alojamiento *indoor* con transporte corto (IDTC); alojamiento *indoor* con transporte largo (IDTL), alojamiento *outdoor* con transporte corto (ODTC) y alojamiento *outdoor* con transporte largo (ODTL).

## 2. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo en el *software* SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en  $P < 0,05$  y la tendencia fue considerada en  $0,05 \leq P \leq 0,1$ . Los datos descriptivos son presentados con la media y el SE (media  $\pm$  SE).

Se realizó el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

## **2.1. Estadística univariante**

Las variables normalmente distribuidas fueron analizadas usando el método UNIANOVA de SPSS con ajuste de Tukey. Las variables con distribución Poisson o multinomial fueron analizadas utilizando el método no-paramétrico GENLIN de SPSS. En todos los modelos, cada animal fue introducido como la unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron el transporte (corto (TC) o largo (TL)), las condiciones de alojamiento (exterior (OD) o interior (ID)) y su interacción (transporte\*alojamiento; T\*A). Además, también se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni.

## **2.2. Correlaciones**

Las correlaciones entre variables fueron analizadas con el método de Pearson para las variables con una distribución normal y con el método de Spearman para las no normales. La visualización en red de las variables se realizó con el lenguaje de programación estadístico en R.

## **2.3. Estadística Multivariante**

Las variables con más del 20 % de datos perdidos o atípicos fueron eliminadas del análisis multivariante (NA en PFC). Para el resto de variables, estos datos perdidos o atípicos fueron reemplazados usando el paquete estadístico de imputación múltiple de SPSS.

Las diferencias entre los 4 grupos experimentales (ODTL, IDTL, ODTC e IDTC) fueron investigadas aplicando la aproximación multivariante de Análisis Discriminante de Fisher. Inicialmente, 23 variables (Pig-MAP, Hp, CK, NA, A y cortisol en suero; cortisol en saliva; c-Fos, ERK1/2, BDNF, PC, NA, DA, DA<sub>total</sub>, 5-HT y IND<sub>total</sub> en HC; c-Fos, ERK1/2, PC, DA, DA<sub>total</sub>, 5-HT, IND<sub>total</sub> en PFC) fueron incluidas en el modelo de análisis discriminante. El método de inclusión por pasos seleccionó las variables en función del estadístico Lambda de Wilks: los valores establecidos de entrada y salida del método fueron 3,84 y 2,71, respectivamente. Además, solo las funciones con autovalores mayores de 1 fueron seleccionadas. Se realizó el procedimiento para validación cruzada, que es la clasificación de cada caso tras dejarlo fuera del cálculo de la función discriminante para validar la robustez y precisión del análisis discriminante.

Una puntuación discriminante fue asignada a cada sujeto para cada función discriminante, estando distribuidas normalmente y con la media en el 0.

### 3. Perfil Bioquímico

Se analizaron los niveles de CK, las APP Hp y Pig-MAP, las catecolaminas NA y A y de cortisol en suero en muestras obtenidas tras el sacrificio, así como también el cortisol en saliva obtenido a la llegada al matadero (después del transporte).

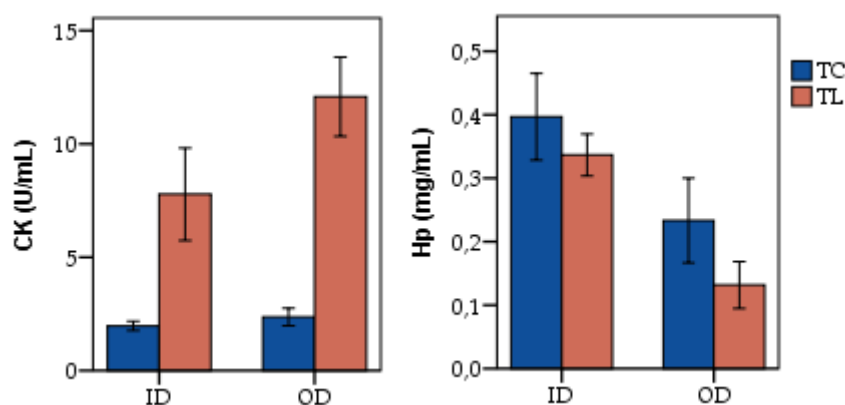
**Tabla 20.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el tercer estudio (media  $\pm$  SE) tras un transporte corto (TC) y un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

Parámetro	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
CK (U/mL)	ID	1,97 $\pm$ 0,20	7,78 $\pm$ 2,04	0,096	<b>&lt;0,001</b>	0,940
	OD	2,37 $\pm$ 0,38	12,08 $\pm$ 1,74			
Hp (mg/mL)	ID	0,4 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,03	<b>0,003</b>	0,149	0,703
	OD	0,23 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,04			
Pig-MAP (mg/mL)	ID	0,93 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,04	0,066	<b>0,006</b>	<b>0,035</b>
	OD	0,69 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,04			
Cortisol suero (ng/mL)	ID	43,70 $\pm$ 2,67	34,43 $\pm$ 5,35	0,901	0,702	0,234
	OD	35,94 $\pm$ 7,15	40,75 $\pm$ 5,85			
Cortisol saliva (ng/mL)	ID	7,34 $\pm$ 1,41	4,99 $\pm$ 0,63	0,347	0,656	0,073
	OD	4,47 $\pm$ 0,93	5,92 $\pm$ 0,78			
NA (ng/mL)	ID	472,36 $\pm$ 32,21	347,03 $\pm$ 28,48	0,863	0,149	<b>&lt;0,001</b>
	OD	289,88 $\pm$ 48,00	517,64 $\pm$ 25,61			
A (ng/mL)	ID	131,77 $\pm$ 17,21	124,57 $\pm$ 22,11	0,377	0,394	0,227
	OD	90,56 $\pm$ 26,14	131,13 $\pm$ 9,30			

P valor < 0,05 marcado en negrita (n = 24). A\*T = interacción alojamiento y transporte.

Para la **CK**, un marcador de daño muscular ampliamente utilizado, hubo un incremento por efecto del transporte largo ( $P < 0,001$ ), mientras que no se vieron diferencias por efecto del alojamiento.

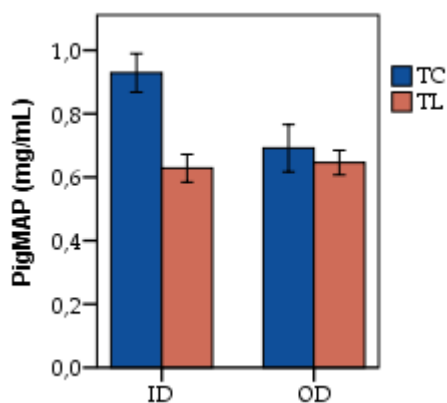
Los niveles de **Hp**, en cambio, se vieron modificados por el efecto de las condiciones de alojamiento ( $P = 0,003$ ) siendo más elevados en los animales alojados en el interior (ID).



**Figura 25.** Representación gráfica de la actividad de la CK y la concentración de Hp en el tercer estudio para los cuatro grupos experimentales: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/*indoor*, OD = exterior/*outdoor*, TC = transporte corto, TL = transporte largo). Las barras representan la media  $\pm$  SE.

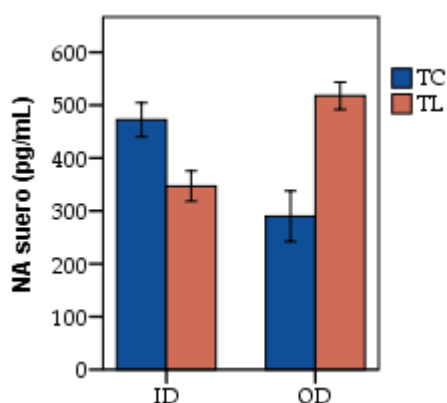


Para la **Pig-MAP** se observaron diferencias significativas para el transporte ( $P = 0,006$ ) y su interacción ( $P = 0,035$ ). La prueba estadística de Bonferroni mostro que los niveles de Pig-MAP eran significativamente mayores en el grupo IDTC que en el IDTL ( $P = 0,001$ ) y que en el ODTC ( $P = 0,007$ ).



**Figura 26.** Representación gráfica de la concentración de PigMAP en el tercer estudio para los cuatro grupos de estudio experimentales: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/*indoor*, OD = exterior/*outdoor*, TC = transporte corto, TL = transporte largo). Las barras representan la media  $\pm$  SE.

En cuanto a las catecolaminas en suero, se vio una interacción entre alojamiento y transporte para la NA. El test Bonferroni reveló niveles más elevados en el grupo ODTL y IDTC que en los animales IDTL ( $P = 0,002$  y  $P = 0,018$ , respectivamente) y ODTC ( $P < 0,001$  y  $P = 0,001$ , respectivamente).



**Figura 27.** Representación gráfica de la concentración de NA en el tercer estudio para los cuatro grupos experimentales: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/*indoor*, OD = parcialmente exterior/*outdoor*, TC = transporte corto, TL = transporte largo). Las barras representan la media  $\pm$  SE.

#### 4. Perfil de NT en la PFC y el hipocampo.

Se determinaron las concentraciones de NT de las vías de las catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, DOPAC y HVA, y 5-HIAA, respectivamente) en amígdala, hipotálamo, hipocampo y PFC. Como valores totales de cada uno de los tipos de NT monoaminérgicos, se realizó la suma de todas las moléculas de la vía dopaminérgica ( $DA_{total}$ ) y de la serotoninérgica ( $IND_{total}$ ).

En la amígdala y el hipotálamo no se observaron diferencias significativas, por lo que no se muestran los resultados.

##### 4.1. PFC

Las medias, SE y  $P$  valores del análisis estadístico de los NT y sus metabolitos en la PFC se muestran en la Tabla 21 y las diferencias estadísticamente significativas están representadas en la Figura 28.

**Tabla 21.** Concentración de los NT y sus metabolitos en la PFC en el tercer estudio (media  $\pm$  SE) tras un transporte corto (TC) o un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

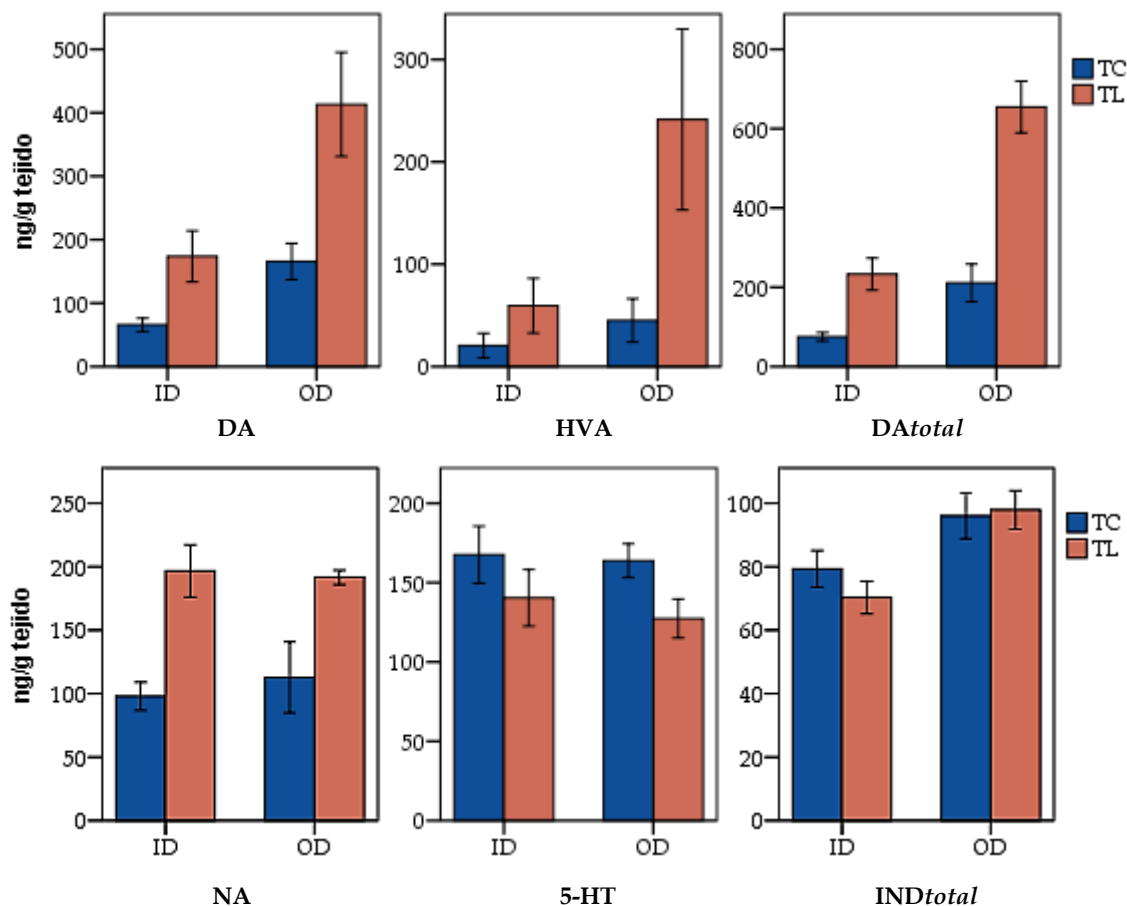
PFC						
Parámetro (ng/g tejido)	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
NA	ID	97,92 $\pm$ 11,12	196,73 $\pm$ 20,67	0,770	<0,001	0,551
	OD	112,83 $\pm$ 27,95	191,6 $\pm$ 5,6			
DA	ID	65,74 $\pm$ 10,35	173,64 $\pm$ 40,36	0,001	0,001	0,830
	OD	165,72 $\pm$ 28,65	413,17 $\pm$ 82,06			
HVA	ID	20,55 $\pm$ 11,95	59,5 $\pm$ 26,68	0,004	<0,001	0,414
	OD	45,14 $\pm$ 21,15	241,42 $\pm$ 88,41			
$DA_{total}$	ID	75,29 $\pm$ 10,81	233,13 $\pm$ 40,38	<0,001	<0,001	0,727
	OD	210,82 $\pm$ 47,27	654,58 $\pm$ 64,92			
5-HT	ID	167,64 $\pm$ 18,01	140,47 $\pm$ 17,84	0,576	0,046	0,757
	OD	163,85 $\pm$ 10,71	127,36 $\pm$ 12,23			
5-HIAA	ID	79,36 $\pm$ 5,77	70,28 $\pm$ 5,17	0,002	0,571	0,389
	OD	96,03 $\pm$ 7,2	97,93 $\pm$ 6,11			
$IND_{total}$	ID	246,99 $\pm$ 23,3	210,75 $\pm$ 21,43	0,494	0,087	0,967
	OD	259,87 $\pm$ 17,24	225,29 $\pm$ 15,84			

$P$  valor < 0,05 marcado en negrita (n = 24). A\*T = interacción de los efectos simples alojamiento y transporte.

Las condiciones de **alojamiento** de interior o parcialmente exterior tienen un efecto significativo en las concentraciones de **DA** y **HVA**, siendo más altas en los animales OD ( $P = 0,001$  y  $P = 0,004$ , respectivamente), llevando a un incremento en los niveles totales del sistema DA ( $P < 0,001$ ).

En cuanto al **transporte**, hay cambios en los tres sistemas de NT estudiados. Los niveles de **NA** ( $P < 0,001$ ), y **DA** ( $P = 0,001$ ), así como su metabolito **HVA** ( $P < 0,001$ ) y en consecuencia

el nivel total del sistema DA ( $P < 0,001$ ) fueron más elevados en los animales sometidos a un transporte largo (TL). En cambio, la concentración de 5-HT fue menor en estos animales ( $P = 0,046$ ).



**Figura 28.** Representación gráfica de los efectos significativos en la concentración de los NT y metabolitos monoaminérgicos en la PFC para el tercer estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los cuatro grupos de estudio: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/indoor, OD = parcialmente exterior/outdoor, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

## 4.2. Hipocampo

Las medias, SE y  $P$  valores del análisis estadístico de los NT y sus metabolitos en el hipocampo se muestran en la Tabla 22 y las diferencias estadísticamente significativas están representadas en la Figura 29.

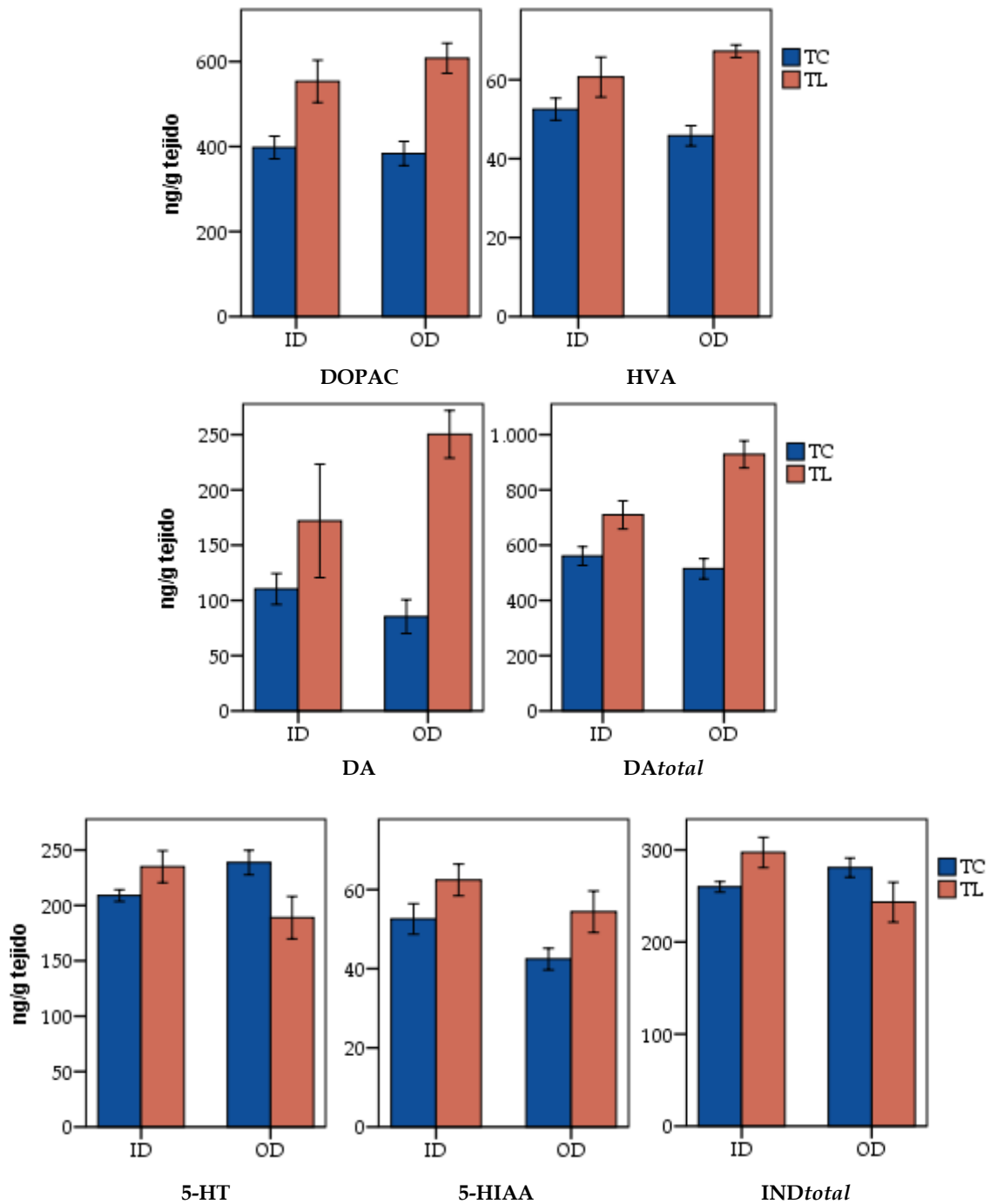
**Tabla 22.** Concentración de los NT y sus metabolitos en el hipocampo en el tercer estudio (media  $\pm$  SE) tras un transporte corto (TC) o un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

Hipocampo						
Parámetro (ng/g tejido)	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
NA	ID	256,96 $\pm$ 30,01	296,6 $\pm$ 56,87	0,818	0,133	0,576
	OD	243,6 $\pm$ 31,32	328,44 $\pm$ 34,48			
DA	ID	110,32 $\pm$ 13,99	172,02 $\pm$ 51,33	0,482	<b>0,005</b>	<b>0,043</b>
	OD	85,36 $\pm$ 15,27	250,37 $\pm$ 21,49			
DOPAC	ID	52,53 $\pm$ 2,8	60,68 $\pm$ 5,05	0,978	<b>&lt;0,001</b>	0,065
	OD	45,8 $\pm$ 2,57	67,22 $\pm$ 1,59			
HVA	ID	397,66 $\pm$ 26,75	553,35 $\pm$ 49,89	0,584	<b>&lt;0,001</b>	0,356
	OD	383,56 $\pm$ 28,49	607,88 $\pm$ 35,39			
DA <sub>total</sub>	ID	560,5 $\pm$ 33,8	709,84 $\pm$ 50,88	0,057	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,006</b>
	OD	514,72 $\pm$ 36,76	928,75 $\pm$ 48,69			
5-HT	ID	208,81 $\pm$ 5,3	234,88 $\pm$ 14,4	0,582	0,419	<b>0,017</b>
	OD	238,71 $\pm$ 11,12	188,9 $\pm$ 19,14			
5-HIAA	ID	52,56 $\pm$ 3,86	62,42 $\pm$ 4	<b>0,037</b>	<b>0,014</b>	0,799
	OD	42,43 $\pm$ 2,73	54,38 $\pm$ 5,25			
IND <sub>total</sub>	ID	259,93 $\pm$ 5,71	297,31 $\pm$ 16,45	0,313	0,997	<b>0,031</b>
	OD	280,78 $\pm$ 10,4	243,28 $\pm$ 21,7			

P valor < 0,05 marcado en negrita (n = 24). A\*T = interacción de los efectos simples alojamiento y transporte.

Las concentraciones de **DA** ( $P = 0,005$ ) y sus metabolitos **DOPAC** ( $P < 0,001$ ) y **HVA** ( $P < 0,001$ ) fueron mayores en los animales sometidos a un **transporte** largo (grupo TL), y como consecuencia también los valores de **DA<sub>total</sub>** ( $P < 0,001$ ). Además, para la DA, se observó una interacción entre los dos factores ( $P = 0,043$ ), y el test de Bonferroni reveló que los niveles de DA estaban más elevados en el grupo ODTL que en el ODTC ( $P = 0,001$ ) y que en el IDTL (tendencia,  $P = 0,056$ ).

Para las **indolaminas**, se observó una disminución en la concentración de 5-HIAA en los animales **OD** respecto a los **ID** ( $P = 0,037$ ). Estos niveles de 5-HIAA también fueron diferentes según las condiciones de **transporte**, siendo mayores en el grupo TL que en el TC ( $P = 0,014$ ). Para la 5-HT y las **IND<sub>total</sub>** hubo interacción entre factores. El test de Bonferroni mostró una menor concentración de estos dos parámetros, 5-HT e **IND<sub>total</sub>**, en los animales ODTL en comparación con los grupos IDTL ( $P = 0,029$  y  $P = 0,022$  respectivamente) y ODTC ( $P = 0,025$  solamente para 5-HT).



**Figura 29.** Representación gráfica de los efectos significativos en la concentración de los NT y metabolitos monoaminérgicos en el hipocampo para el tercer estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los cuatro grupos de estudio: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/*indoor*, OD = parcialmente exterior/*outdoor*, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

### 4.3. Marcadores moleculares de estrés en la PFC y el hipocampo: c-Fos, ERK1/2 y carbonilación de proteínas

La abundancia proteica de dos marcadores de estrés, c-Fos y ERK1/2, y los niveles de carbonilación de proteínas (CP) como marcador de estrés oxidativo fueron analizadas en la PFC y el hipocampo por *western blot*. Los resultados de c-Fos y ERK1/2 son presentados como ratios entre el valor de absorbancia (AU) de la banda correspondiente a la proteína de estudio y el AU de la banda de  $\beta$ -actina. Además se realizó una corrección mediante la muestra repetida en todos los geles para corregir la variabilidad intergel. Los resultados de CP también se muestran como ratios entre la AU correspondiente al DNP unido a los grupos carbonilo de las proteínas y la  $\beta$ -actina.

Los valores de estas determinaciones en la PFC se muestran en la Tabla 23, y los del hipocampo en la Tabla 24, junto a los *P* valores del análisis estadístico en ambos casos.

**Tabla 23.** Niveles de expresión de los marcadores moleculares de estrés, c-Fos y ERK1/2 y del grado de carbonilación de proteínas (CP) en la PFC para el tercer estudio tras un transporte corto (TC) o un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

PFC						
Parámetro	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
CP	ID	0,85 ± 0,09	0,60 ± 0,07	0,135	0,076	0,353
	OD	0,62 ± 0,09	0,54 ± 0,10			
c-Fos	ID	0,75 ± 0,21	0,76 ± 0,12	0,257	0,887	0,942
	OD	0,99 ± 0,28	1,03 ± 0,15			
ERK1/2	ID	0,56 ± 0,15	0,58 ± 0,19	0,693	0,400	0,458
	OD	0,50 ± 0,08	0,79 ± 0,22			

Expresados como ratios AU marcador/AU  $\beta$ -actina (media  $\pm$  SE, n = 24). A\*T = interacción de los efectos simples alojamiento y transporte.

En la **PFC** no hubo diferencias en la abundancia de c-Fos, ERK1/2 ni el contenido de CP debido a las condiciones de alojamiento, como tampoco al transporte por carretera.

En el **hipocampo**, no hubo diferencias en estas dos proteínas según las condiciones de alojamiento, pero si un aumento en el grupo de animales sometidos a un transporte largo (LT). El análisis estadístico mostró el efecto significativo del **transporte** para **c-Fos** ( $P = 0,036$ ) y una tendencia para **ERK1/2** ( $P = 0,055$ ).

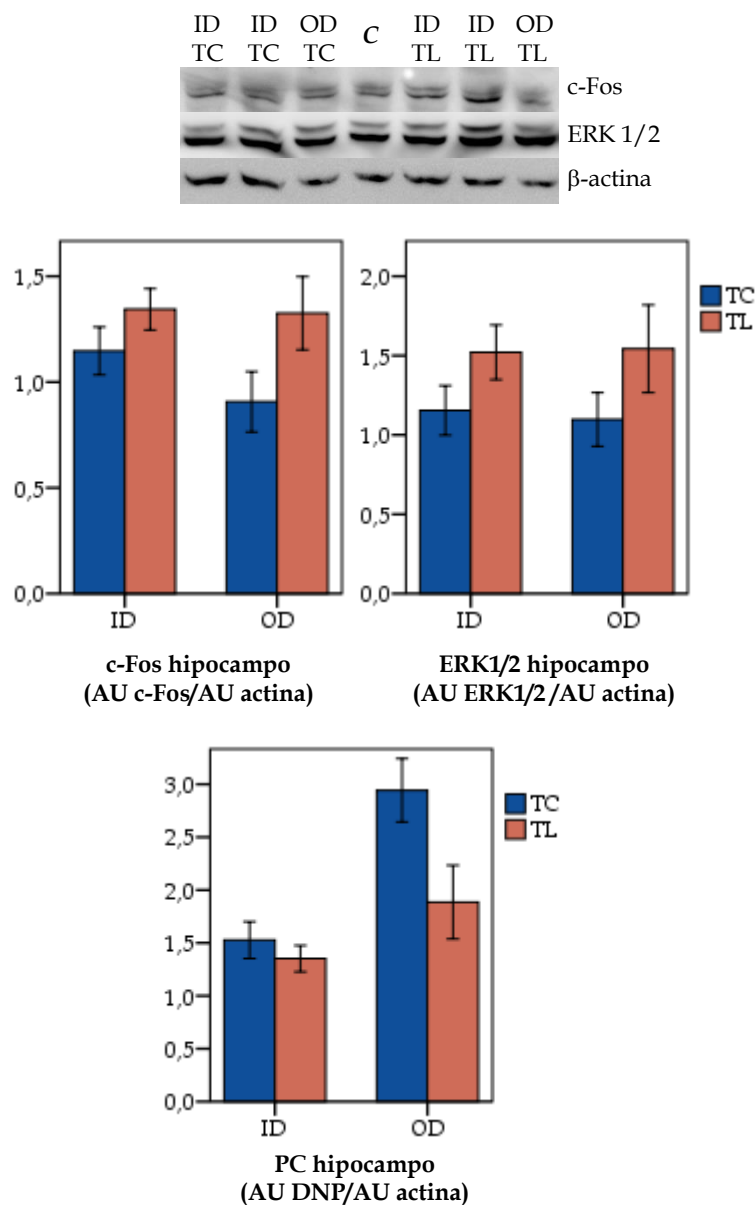
Por otro lado, los niveles de **CP** en el **hipocampo** se vieron afectados tanto por las condiciones de **alojamiento**, siendo menores en los animales alojados en el interior ( $P = 0,001$ ), como por el **transporte**, siendo menor en el grupo LT ( $P = 0,025$ ).

**Tabla 24.** Niveles de expresión de los marcadores moleculares de estrés, c-Fos y ERK1/2 y del grado de carbonilación de proteínas (CP) en el hipocampo para el tercer estudio tras un transporte corto (TC) o un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

Hipocampo						
Parámetro	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
CP	ID	1,53 ± 0,75	1,35 ± 0,13	<b>0,001</b>	<b>0,025</b>	0,097
	OD	2,94 ± 0,30	1,89 ± 0,35			
c-Fos	ID	1,15 ± 0,11	1,34 ± 0,10	0,351	<b>0,036</b>	0,424
	OD	0,91 ± 0,14	1,33 ± 0,17			
ERK1/2	ID	1,15 ± 0,16	1,52 ± 0,17	0,933	0,055	0,842
	OD	1,10 ± 0,17	1,54 ± 0,28			

P valor < 0,05 marcado en negrita. A\*T = interacción de los efectos simples alojamiento y transporte.

En la siguiente figura (Figura 30) se muestra una imagen representativa de los *western blot* realizados para la determinación de c-Fos y ERK1/2, así como los gráficos de las diferencias significativas.



**Figura 30.** Resultados significativos c-Fos, ERK1/2 y CP en el hipocampo para el tercer estudio. En la parte superior imagen de *western blot* representativo de c-Fos y ERK1/2. En la representación gráfica, las barras representan la media  $\pm$  SE de los cuatro grupos de estudio: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/*indoor*, OD = parcialmente exterior/*outdoor*, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

#### 4.4. BDNF en Hipocampo

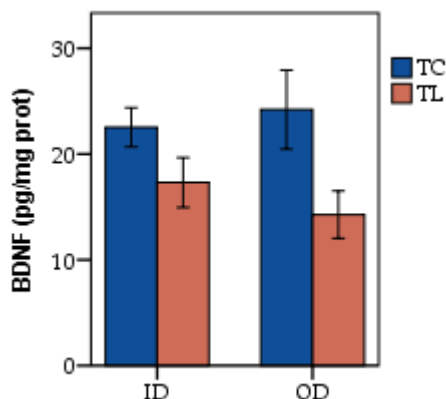
Se determinaron los niveles del factor neurotrófico BDNF en el hipocampo. Como se muestra en la Tabla 25 y en la Figura 31, el análisis estadístico desveló una disminución de sus niveles en los animales TL respecto a los TC ( $P = 0,012$ ).



**Tabla 25.** Concentración de BDNF en el hipocampo en el tercer estudio (media  $\pm$  SE) tras un transporte corto (TC) o un transporte largo (TL) y según las condiciones de alojamiento, en interior (ID) o con acceso al exterior (OD).

Parámetro (pg/mg proteína)	Alojamiento	Transporte		P valores		
		TC	TL	Alojamiento	Transporte	A*T
BDNF	ID	22,53 $\pm$ 1,84	17,31 $\pm$ 2,36	0,804	<b>0,012</b>	0,397
	OD	24,20 $\pm$ 3,74	14,27 $\pm$ 2,24			

P valor < 0,05 marcado en negrita (n = 24). A\*T = interacción de los efectos simples alojamiento y transporte.



**Figura 31.** Representación gráfica de la concentración de BDNF en el hipocampo en el tercer estudio. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los cuatro grupos de estudio: IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/indoor, OD = parcialmente exterior/outdoor, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

#### 4.5. Análisis Multivariante

Se realizó un análisis discriminante utilizando 23 variables procedentes de medidas realizadas en el hipocampo, la PFC y suero (Pig-MAP, Hp, CK, NA, A y cortisol en suero; cortisol en saliva; c-Fos, ERK1/2, BDNF, PC, NA, DA, DA<sub>total</sub>, 5-HT y IND<sub>total</sub> en hipocampo; c-Fos, ERK1/2, PC, DA, DA<sub>total</sub>, 5-HT, IND<sub>total</sub> en PFC), el cual seleccionó 4 variables y 3 funciones discriminantes que estaban claramente asociadas con los tratamientos realizados. Estas 4 variables fueron: DA<sub>total</sub> en la PFC, NA en el suero, CP en el hipocampo y 5-HT en el hipocampo.

Las funciones seleccionadas mostraron un valor Lambda de Wilk significativo (Función 1: lambda = 0,021, P < 0,001; Función 2: lambda = 0,178, P < 0,001; Función 3: lambda = 0,639, P = 0,014), pero solo las funciones discriminantes 1 y 2 mostraron autovalores mayores que 1 y por lo tanto fueron incluidas en el análisis posterior. La función discriminante 1 explicó el 70,70 % de la varianza de los datos y la función discriminante 2 el 24,00 %.

Los coeficientes de las variables seleccionadas en cada una de las funciones se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Estadísticos del análisis discriminante del tercer estudio. Lambda de Wilks, autovalores, proporciones acumuladas y coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes (FD) seleccionadas en el análisis.

	FD 1	FD 2
Wilks' Lambda	0,021	0,178
Significancia	< 0,001	< 0,001
Autovalor	7,604	2,586
Proporción acumulada(%)	70,70	94,70
<b>Variables</b>		
PC (HC)	-0,273	0,702
NA (suero)	0,671	-0,641
Sistema DA (PFC)	0,975	0,413
5-HT (HC)	-0,677	0,357

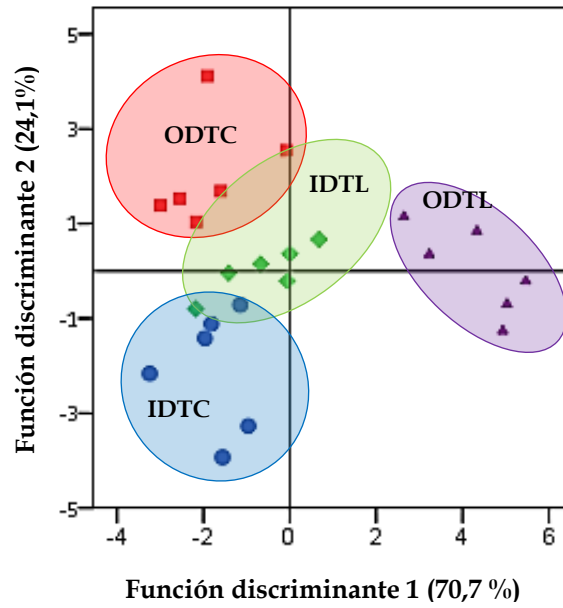
La autoverificación utilizando la validación cruzada, que consiste en dejar el animal a clasificar fuera de la asignación, mostró una elevada precisión (83,3 %).

**Tabla 27.** Resultados de la clasificación de autoverificación del análisis discriminante del tercer estudio. Por filas, la predicción de clasificación de cada grupo experimental: en la primera columna la correspondencia real al grupo de estudio de los individuos a clasificar, en las siguientes columnas la predicción de clasificación de estos individuos (número de individuos y porcentaje).

Clasificación actual	Predicción de correspondencia a grupo			
	IDTC (%)	IDTL (%)	ODTC (%)	ODTL (%)
IDTC	5 (83,3)	1 (16,7)	0	0
IDTL	1 (16,7)	5 (83,3)	0	0
ODTC	0	2 (33,3)	4 (66,7)	0
ODTL	0	0	0	6 (100)
21 individuos clasificados correctamente (83,3%)				

Grupos IDTC, IDTL, ODTC (ID = interior/indoor, OD = parcialmente exterior/outdoor, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

Se le asignó a cada animal la puntuación correspondiente para cada una de las dos funciones seleccionadas y se realizó un gráfico de puntuaciones. La función 1 discriminó claramente los animales ODTL de los otros grupos. En cambio la función 2 fue capaz de discriminar los grupos IDTC y ODTC. Hay poco solapamiento entre las elipses de confianza de los grupos, indicando, como ya lo muestra la autoverificación, la capacidad de distinguir entre grupos con estas 4 variables.



**Figura 32.** Gráfico de puntuaciones del análisis discriminante del tercer estudio. Cada sujeto es representado según el valor otorgado para las funciones discriminantes 1 y 2. Los cuatro colores de los puntos y de los ovals agrupadores representan los 4 grupos experimentales (IDTC, IDTL, ÓDTC (ID = interior/indoor, OD = parcialmente exterior/outdoor, TC = transporte corto, TL = transporte largo).

## CAPÍTULO 4: ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

El enriquecimiento ambiental (EE) en producción porcina es conocido por tener un efecto positivo en el bienestar animal. Entre los factores que influyen se encuentra el enriquecimiento físico provocado por mayor disponibilidad de espacio o mejoras en el lecho incorporando materiales como paja, que se ha descrito que produce efectos positivos tanto conductuales como fisiológicos (Jong et al., 2000; Millet, Moons, Oeckel, et al., 2005; Simpson & Kelly, 2011). Entre estos efectos positivos se encuentra una mejora de la memoria, el aprendizaje y/o las habilidades cognitivas, una reducida ansiedad y conducta depresiva y una mejora en las habilidades de afrontar el estrés (Batzina et al., 2014; Segovia, Arco, Blas, Garrido, & Mora, 2008).

El estrés, como ya se ha definido, es el estado psicológico y emocional de un animal haciendo frente a una situación percibida como amenazante. En la vida de los animales, concretamente en cerdos, se han descrito varios estresores como la mezcla, el transporte o el sacrificio. Mejorando las condiciones durante el período de cría puede conducir a una mejor habilidad para hacer frente a los factores que pueden suponer estrés en los momentos previos al sacrificio (Fernández-Teruel et al., 2002).

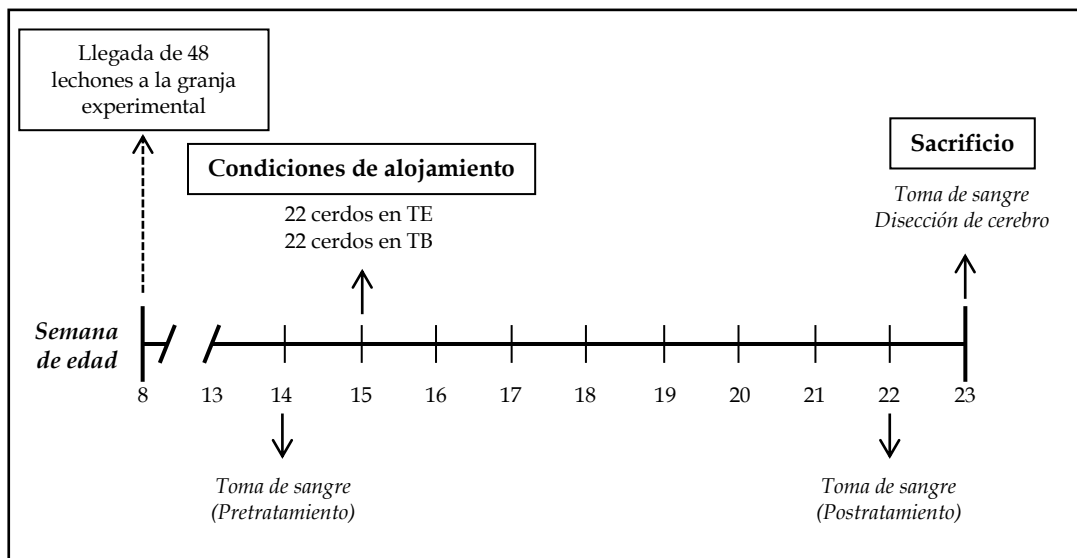
## 1. Diseño experimental

En este estudio se utilizaron 44 lechones hembra procedentes del cruce de cerdas Large White x Landrace libres para el gen halotano (RYR1; NN) con machos Pietrain heterocigotos para el gen halotano (Nn) de la misma granja comercial.

El cronograma del estudio descrito a continuación se muestra en la figura 34. Los animales fueron trasladados a las instalaciones experimentales del IRTA a la edad de 8 semanas, donde se estabularon durante 7 semanas en 1 nave de 4 corrales con *slat* total (5 m x 2,70 m) con 11 animales cada una, manteniendo así una densidad de 1,2 m<sup>2</sup>/cerdo. En la semana 14 de edad, una semana antes del inicio de los tratamientos, se realizó la primera toma de muestra de sangre, correspondiente a la medida pretratamiento. A partir de la semana 15 y durante 8 semanas, en dos de los corrales se mantuvo la densidad de 1,2 m<sup>2</sup>/cerdo pero se cambió el suelo a hormigón con 700 g de paja/cerdo que se fue cambiando cada 2-3 días, considerándose estas condiciones el tratamiento enriquecido (TE). En los otros dos corrales se redujo el espacio llevando la densidad a 0,7 m<sup>2</sup>/cerdo y se mantuvieron las condiciones de corral, considerándose estas condiciones el tratamiento empobrecido (TB).

Todos los grupos se instalaron en la misma nave, con luz natural y temperatura ambiental de 22 ± 3 °C, bebederos de acero (15 cm x 16 cm) conectados con chupete de acero y un comedero de hormigón (58 cm x 34 cm) con 4 posiciones de alimentación, disponiendo de agua y comida ad libitum. Fueron examinados diariamente y no se observaron problemas de salud durante el período experimental.

A las 22 semanas de edad se realizó la segunda toma de muestra de sangre, que corresponde a la medida postratamiento. Una semana después, con 23 semanas de edad, los animales fueron mantenidos 8 h en ayuno antes de ser transportados de la granja experimental al matadero experimental (1,2 km de distancia). Los animales fueron aturdidos en grupos de dos por exposición durante 3 min a 90 % de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico y posteriormente desangrados. En este punto se obtuvo la tercera muestra de sangre, correspondiente a la medida en el sacrificio, y se diseccionaron las áreas de interés tal y como se detalla en el apartado 2.3 de Material y Métodos. Además, en este último estudio también se analizó el núcleo estriado debido a su relación con la motivación y la recompensa (Yager, Garcia, Wunsch, & Ferguson, 2015).



**Figura 33.** Cronograma del estudio del capítulo 4. Llegada a la granja experimental a las 8 semanas de edad, muestreo de sangre en la semana 14 (pretratamiento), inicio de los tratamientos en distintas condiciones de alojamiento (ambiente enriquecido, TE o ambiente empobrecido TB) en la semana 15; segundo muestreo de sangre en la semana 22 (postratamiento); sacrificio en la semana 23 con muestreo de sangre y disección del cerebro.

## 2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el *software* Statistical Analyses System (SAS v9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El nivel de significancia fue establecido en  $P < 0,05$  y la tendencia fue considerada en  $0,05 \leq P \leq 0,1$ . Los datos descriptivos son presentados con la media y el SE (media  $\pm$  SE).

Se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a logaritmo para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

### 2.1. Muestras de suero

Se utilizó el modelo MIXED con medidas repetidas para poder comparar las variaciones debidas al efecto del tratamiento (postratamiento vs pretratamiento) y del estrés por sacrificio (sacrificio vs postratamiento). En el modelo factorial, cada animal fue introducido como unidad experimental, el corral como efecto aleatorio anidado, las distintas tomas de muestra como efecto intra-sujetos, el tratamiento (TE o TB) como efecto inter-sujetos y su interacción. También se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni.

### 2.2. Muestras medidas solo en el sacrificio

Las catecolaminas en el suero, así como las distintas determinaciones en tejidos del SNC solo se determinaron en el momento del sacrificio. Las variables normalmente distribuidas fueron analizadas usando el método MIXED de SAS con ajuste de Tukey. Las variables con distribución Poisson o multinomial fueron analizadas utilizando el método GLIMMIX de SAS. En todos los modelos, cada animal fue introducido como la unidad experimental y las condiciones de alojamiento (enriquecido (E) o empobrecido (B)) como efecto fijo.

### **2.3. Correlaciones**

Las correlaciones entre variables relacionadas con el estrés oxidativo fueron analizadas con el método de Pearson para las variables con una distribución normal y con el método de Spearman para las no normales.

El análisis estadístico de los datos de proteómica se realizó según se describe en el Apartado 8.6 de Material y Métodos.

## **3. Perfil Bioquímico**

Se analizaron los niveles en suero de CK como marcador de daño muscular; de colesterol como marcador del metabolismo energético; Hp como APP, la actividad enzimática en suero de dos enzimas relacionadas con los mecanismos antioxidantes, la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y la GPx que actúa detoxificando peróxidos de hidrógeno y de cortisol en tres tiempos distintos: previamente (pretratamiento) al inicio de los tratamientos (enriquecido o empobrecido), el segundo al finalizar el tratamiento (postratamiento, una semana antes del sacrificio), y el último en el sacrificio. Los niveles de las catecolaminas NA y A como marcadores de activación del eje SAM de respuesta a estrés solamente se determinaron en el momento del sacrificio.

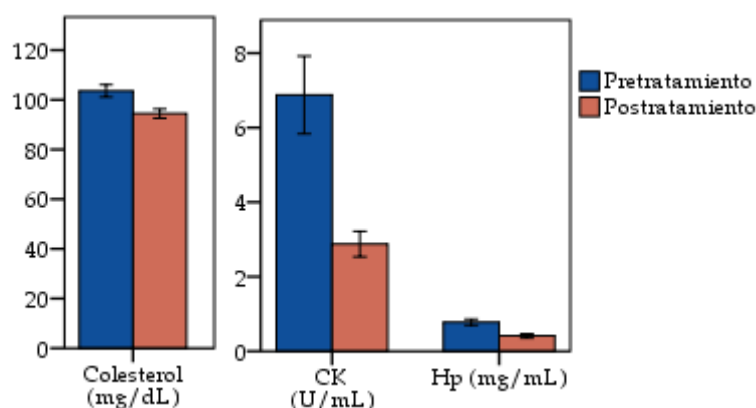
El análisis estadístico se dividió en dos partes. La primera parte consistió en establecer las diferencias causadas por el tratamiento. Para ello se determinaron los *P* valores de las diferencias entre los dos primeros tiempos medidos (postratamiento vs pretratamiento) y la interacción con el tratamiento (tiempo\*tratamiento). En este análisis estadístico un *P* valor significativo entre el valor en el postratamiento y el pretratamiento (efecto tiempo), pero no en la interacción indica diferencias causadas por el factor tiempo en sí, sin tener ningún efecto el tratamiento aplicado. En cambio, una interacción significativa indica que aquella medida presenta una evolución entre los dos tiempos diferente en cada uno de los grupos de estudio. Los valores de las determinaciones según el tiempo y el tratamiento, así como estos *P* valores se detallan en la Tabla 28.

**Tabla 28.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el cuarto estudio, antes del inicio del tratamiento (pretratamiento) y a la finalización del tratamiento y al finalizar (postratamiento) según el tratamiento aplicado (TE = tratamiento enriquecido; TB = tratamiento empobrecido) por filas.

Parámetro	Tratamiento	Toma de muestra		P valores	
		Pretratamiento	Postratamiento	Tiempo	Tiempo* tratamiento
CK (U/mL)	TE	6,02 ± 1,58	2,34 ± 0,29	<b>0,001</b>	0,77
	TB	7,73 ± 1,37	3,41 ± 0,61		
Colesterol (mg/dL)	TE	103,58 ± 4,26	89,33 ± 2,79	<b>0,001</b>	0,059
	TB	103,59 ± 2,62	99,60 ± 2,07		
Lactato (mmol/L)	TE	5,08 ± 0,45	2,75 ± 0,34	<b>0,002</b>	<b>0,044</b>
	TB	4,58 ± 0,43	4,03 ± 0,45		
Hp (mg/mL)	TE	0,82 ± 0,13	0,37 ± 0,05	<b>&lt;0,001</b>	0,316
	TB	0,73 ± 0,10	0,46 ± 0,10		
GPx (U/mL)	TE	3,58 ± 0,16	5,40 ± 0,19	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,032</b>
	TB	3,82 ± 0,12	6,09 ± 0,21		
SOD (U/mL)	TE	0,32 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,224	0,518
	TB	0,32 ± 0,03	0,30 ± 0,04		
Cortisol (ng/mL)	TE	24,27 ± 2,79	16,77 ± 2,03	0,249	0,049
	TB	24,69 ± 3,45	26,42 ± 3,38		

Representado como media ± SE, n = 44. P valores de las diferencias en global entre los dos tiempos, y de la interacción con el tratamiento.

Los parámetros que mostraron diferencias significativas para el efecto del **tiempo** son la **CK** ( $P = 0,001$ ), la **Hp** ( $P < 0,001$ ) y el **colesterol** ( $P = 0,001$ ) que muestran una disminución tras finalizar el tratamiento, tanto en el grupo enriquecido como en el empobrecido.



**Figura 34.** Representación gráfica de los niveles de colesterol, CK y Hp en suero en el pretratamiento y el postratamiento del cuarto estudio. Las barras representan la media ± SE.

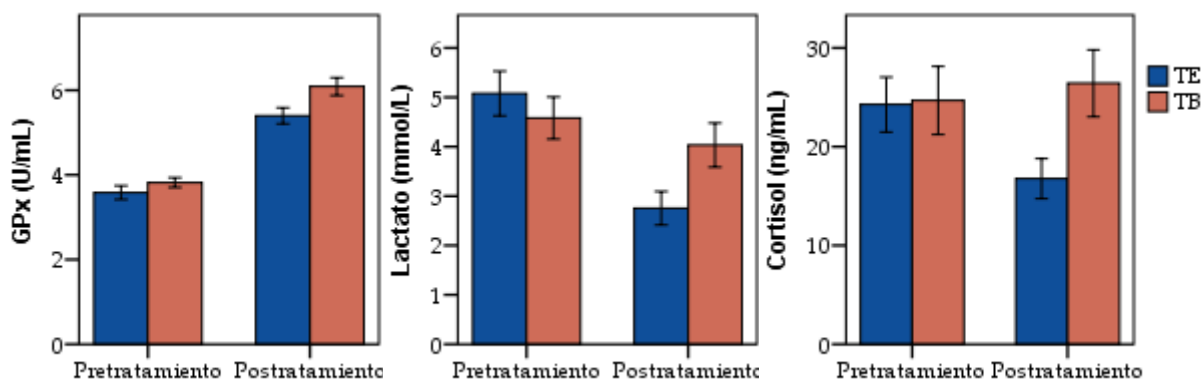
En cambio, la **GPx**, el **lactato** y el **cortisol** tienen una interacción significativa, sugiriendo una evolución diferencial entre grupos de tratamiento. De las comparaciones múltiples por Bonferroni se obtienen los siguientes P valores:



**Tabla 29.** *P* valores de la comparación por pares con ajuste Bonferroni para evaluar el efecto del tratamiento en el cuarto estudio. Comparación postratamiento vs pretratamiento en el grupo sometido a tratamiento enriquecido (TE, primera columna) y en el grupo en tratamiento empobrecido (TB, segunda columna).

Parámetro	TE: <i>post vs pre</i>	TB: <i>post vs pre</i>
Lactato	<0,001	0,367
GPx (U/mL)	<0,001	<0,001
Cortisol (ng/mL)	0,031	0,540

La GPx muestra mayor actividad tras el tratamiento en los dos grupos de estudio. El valor significativo de la interacción indica que el incremento es mayor en el grupo TB. Para el lactato y el cortisol, el efecto de la interacción indica reducciones en sus niveles tras la finalización de los tratamientos únicamente en el grupo TE.



**Figura 35.** Representación gráfica de los niveles de GPx, lactato y cortisol colesterol, CK y Hp en el cuarto estudio (tiempo y tratamiento). Las barras representan la media ± SE.

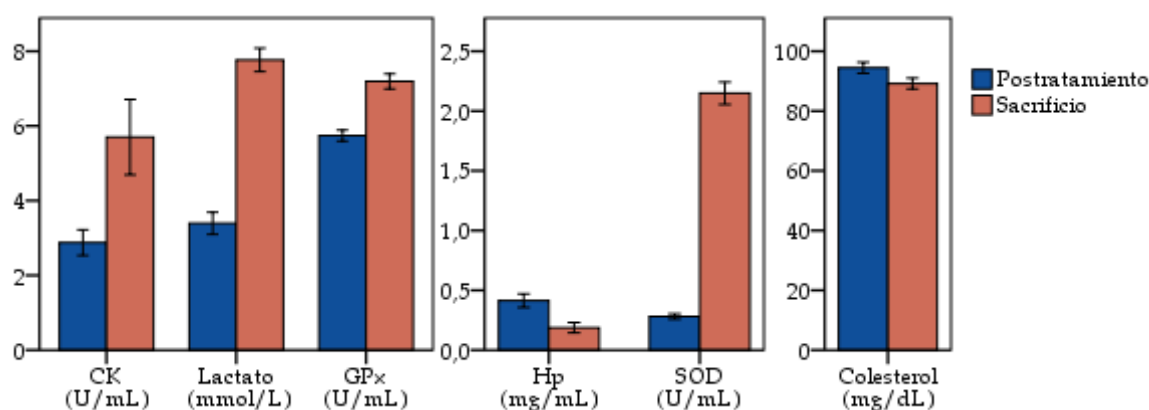
La segunda parte del análisis estadístico se enfocó a evaluar las diferencias causadas el sacrificio (efecto sacrificio) y por la distinta forma de afrontar el sacrificio según el tratamiento (sacrificio\*tratamiento). Para ello se determinaron los *P* valores de las diferencias entre los dos tiempos y su interacción con el tratamiento. Una interacción significativa indica que aquella medida presenta una evolución diferente entre los dos grupos de estudio. Los valores de las determinaciones según el tiempo (postratamiento y sacrificio) y el tratamiento, así como los *P* valores se detallan en la Tabla 30.

**Tabla 30.** Niveles de los marcadores de estrés medidos en suero en el cuarto estudio, antes del sacrificio (postratamiento) y en el sacrificio según el tratamiento aplicado (TE = tratamiento enriquecido; TB = tratamiento empobrecido) por filas. Representado como media  $\pm$  SE, n = 44. P valores del efecto global del sacrificio, y de la interacción con el tratamiento.

Parámetro	Tratamiento	Toma de muestra		P valores	
		Postratamiento	Sacrificio	Sacrificio	Sacrificio * Tratamiento
CK (U/mL)	TE	2,34 $\pm$ 0,29	4,10 $\pm$ 0,68	<b>0,01</b>	0,315
	TB	3,41 $\pm$ 0,61	7,31 $\pm$ 1,86		
Colesterol (mg/dL)	TE	89,33 $\pm$ 2,79	86,49 $\pm$ 2,63	<b>&lt;0,001</b>	0,082
	TB	99,60 $\pm$ 2,07	91,93 $\pm$ 2,28		
Lactato (mmol/L)	TE	2,75 $\pm$ 0,34	7,54 $\pm$ 0,49	<b>&lt;0,001</b>	0,271
	TB	4,03 $\pm$ 0,45	8,00 $\pm$ 0,39		
Hp (mg/mL)	TE	0,37 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,06	<b>&lt;0,001</b>	0,467
	TB	0,46 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,06		
GPx (U/mL)	TE	5,40 $\pm$ 0,19	7,02 $\pm$ 0,28	<b>&lt;0,001</b>	0,095
	TB	6,09 $\pm$ 0,21	7,37 $\pm$ 0,29		
SOD (U/mL)	TE	0,26 $\pm$ 0,03	2,24 $\pm$ 0,12	<b>&lt;0,001</b>	0,927
	TB	0,30 $\pm$ 0,04	2,21 $\pm$ 0,14		
Cortisol (ng/mL)	TE	16,77 $\pm$ 2,03	18,97 $\pm$ 2,42	0,109	0,064
	TB	26,42 $\pm$ 3,38	20,52 $\pm$ 2,29		

En este caso los cambios son debidos al tratamiento pero no hay ninguna interacción significativa que esté indicando una respuesta diferente al sacrificio entre ambos grupos.

Se da un aumento significativo de los niveles de **CK, lactato, GPx y SOD** y una disminución de **colesterol y Hp** en el **sacrificio**. Para el cortisol no se observan diferencias significativas.



**Figura 36.** Representación gráfica de los niveles de CK, lactato, GPx, Hp, SOD y colesterol en suero en el cuarto estudio en la segunda toma de muestra (postratamiento) y en el sacrificio. Las barras representan la media  $\pm$  SE.

Para las catecolaminas no se pudieron comparar las concentraciones con los niveles previos en el mismo animal, por lo que el análisis estadístico se orientó a establecer las diferencias

entre TE y TB en el momento del sacrificio. Como se muestra en la Tabla 31, no hubo diferencias significativas en los niveles de NA y A entre las dos condiciones.

**Tabla 31.** Concentración de NA y A en el suero en el cuarto estudio: dos grupos de tratamiento (TE y TB).

Parámetro	Alojamiento		P valor
	Enriquecido (TE)	Empobrecido (TB)	
NA (ng/mL)	212,31 ± 12,17	242,19 ± 20,36	0,359
A (ng/mL)	69,05 ± 5,17	85,51 ± 7,76	0,086

Resultados expresados como media ± SE y el P valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos (n = 44).

#### 4. Marcadores de estrés oxidativo

Se analizó en la PFC y el hipocampo el grado de oxidación de las proteínas (CP) por *oxyblot* y el grado de peroxidación lipídica (PL) mediante la determinación de los niveles de uno de los productos final de la PL, el malondialdehído (MDA). Los resultados de CP se muestran como ratios entre la absorbancia correspondiente al DNP unido a los grupos carbonilo de las proteínas y la  $\beta$ -actina; y los de PL como nanomoles de MDA en gramo de tejido. Los resultados junto a los P valores del análisis estadístico se muestran en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Contenido de grupos carbonilos en las proteínas (CP) y de peroxidación lipídica (PL) en hipocampo y PFC para el cuarto estudio: dos grupos de tratamiento (TE y TB).

Parámetro	Alojamiento		P valor
	Enriquecido (TE)	Empobrecido (TB)	
PFC CP	1,75 ± 0,15	1,54 ± 0,12	0,390
Hipocampo CP	0,93 ± 0,08	0,92 ± 0,07	0,958
PFC PL	2,66 ± 0,29	2,64 ± 0,26	0,990
Hipocampo PL	2,06 ± 0,22	2,04 ± 0,29	0,551

Resultados expresados como media ± SE y el P valor correspondiente a las diferencias entre los dos grupos (n = 44).

No se observó ninguna diferencia significativa en estos parámetros entre los dos grupos de estudio.

Para establecer si el grado de estrés oxidativo en SNC y marcadores de suero tienen relación, se evaluaron las correlaciones entre estas medidas (Tabla 33).

Hubo correlación positiva entre las actividades de la SOD y la GPx ( $R^2 = 0,345$ ,  $P = 0,032$ ) y entre los niveles de peroxidación lipídica en la PFC y el hipocampo ( $R^2 = 0,652$ ,  $P < 0,001$ ) y correlación negativa entre la CP entre estas dos regiones ( $R^2 = -0,344$ ,  $P = 0,040$ ).

**Tabla 33.** Correlación entre las variables relacionadas con el estrés oxidativo.

		SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	CP PFC	CP Hipocampo	PL PFC	PL Hipocampo
SOD (U/mL)	<b>R<sup>2</sup></b>		<b>0,345</b>	0,010	0,019	-0,097	-0,019
	<b>P valor</b>		<b>0,032</b>	0,954	0,907	0,541	0,907
GPx (U/mL)	<b>R</b>			-0,111	-0,076	-0,003	-0,121
	<b>Sig</b>			0,531	0,643	0,984	0,449
CP PFC	<b>R<sup>2</sup></b>				<b>-0,344</b>	0,091	-0,037
	<b>P valor</b>				<b>0,040</b>	0,593	0,826
CP Hipocampo	<b>R<sup>2</sup></b>					-0,194	-0,104
	<b>P valor</b>					0,214	0,505
PL PFC	<b>R<sup>2</sup></b>						<b>0,652</b>
	<b>P valor</b>						<b>&lt; 0,001</b>
PL Hipocampo	<b>R<sup>2</sup></b>						
	<b>P valor</b>						

Marcadas en negrita las correlaciones significativas.

## 5. Perfil de NT en las distintas áreas cerebrales

Se determinaron las concentraciones de NT de las vías de las catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, DOPAC y HVA; y 5-HIAA, respectivamente) mediante HPLC en amígdala, hipotálamo, hipocampo, PFC y núcleo estriado. Como valor total de cada uno de los tipos de NT monoaminérgicos, se calculó la suma de todas las moléculas involucradas en la vía de la dopamina (*DA<sub>total</sub>*) y de las indolaminas (*IND<sub>total</sub>*).

Las concentraciones de las monoaminas cerebrales y sus metabolitos en las regiones descritas se presentan en la Tabla 34 y las diferencias significativas están representadas en las Figuras 38-41.

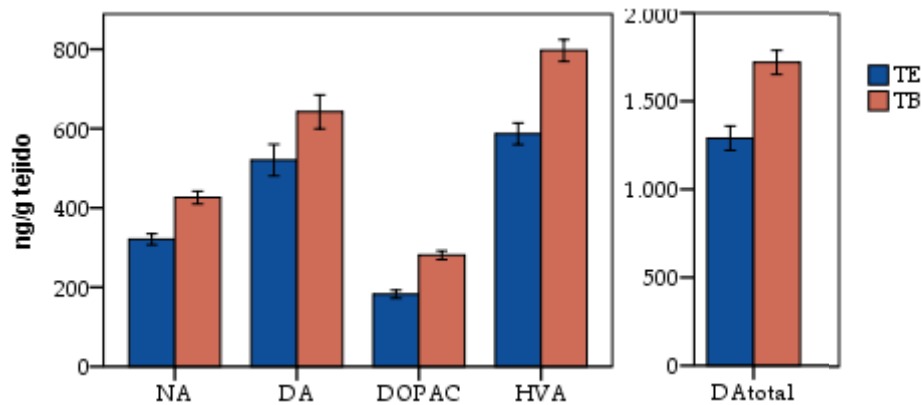
**Tabla 34.** Concentración de los NT y sus metabolitos en las 5 regiones analizadas en el cuarto estudio. Representado como media ± SE en los dos grupos de tratamiento (TE = enriquecido; TB = empobrecido).

Parámetro (ng/g tejido)	Alojamiento		P valor	
	Enriquecido (TE)	Empobrecido (TB)		
Amígdala	NA	333,17 ± 15,20	427,52 ± 15,48	<b>0,040</b>
	DA	520,50 ± 39,56	656,07 ± 42,74	<b>0,026</b>
	DOPAC	190,87 ± 11,11	280,79 ± 11,01	<b>0,001</b>
	HVA	610,50 ± 30,77	797,11 ± 27,33	<b>0,047</b>
	DA <sub>total</sub>	1289,91 ± 69,22	1720,14 ± 68,02	<b>0,008</b>
	5-HT	900,88 ± 57,65	1241,65 ± 124,77	0,512
	5-HIAA	205,30 ± 10,81	367,53 ± 41,66	0,216
	IND <sub>total</sub>	1106,18 ± 64,81	1609,18 ± 164,57	0,435
PFC	NA	123,91 ± 3,03	177,41 ± 7,64	<b>0,020</b>

	DA	41,78 ± 2,32	48,56 ± 2,97	0,349
	DOPAC	16,32 ± 1,07	28,04 ± 2,26	<b>0,009</b>
	HVA	79,48 ± 5,35	121,34 ± 5,87	<b>0,021</b>
	<i>DA<sub>total</sub></i>	137,66 ± 8,05	192,48 ± 10,10	<b>0,040</b>
	5-HT	108,20 ± 16,13	246,29 ± 29,30	0,389
	5-HIAA	50,89 ± 2,09	114,16 ± 8,67	0,153
	<i>IND<sub>total</sub></i>	159,62 ± 16,38	360,45 ± 37,35	0,309
Hipocampo	NA	177,69 ± 5,46	232,37 ± 19,97	0,545
	DA	29,66 ± 1,76	48,76 ± 3,08	0,085
	DOPAC	67,29 ± 1,92	90,87 ± 5,82	0,440
	HVA	81,77 ± 4,90	141,00 ± 13,85	0,161
	<i>DA<sub>total</sub></i>	178,72 ± 7,21	283,68 ± 22,52	0,320
	5-HT	401,24 ± 24,51	497,51 ± 46,96	0,681
	5-HIAA	119,30 ± 3,89	192,50 ± 15,22	0,298
	<i>IND<sub>total</sub></i>	520,54 ± 27	690,01 ± 61,42	0,542
Hipotálamo	NA	3470,85 ± 249,62	3696,79 ± 201,14	0,557
	L-DOPA	1016,32 ± 63,17	1203,79 ± 66,64	0,096
	DA	361,03 ± 25,27	601,58 ± 42,56	0,054
	DOPAC	1098,54 ± 42,95	1248,98 ± 57,60	0,438
	HVA	852,93 ± 36,13	990,34 ± 49,50	0,447
	<i>DA<sub>total</sub></i>	2312,51 ± 59,63	2840,90 ± 129,91	0,389
	5-HT	1069,28 ± 71,93	1532,47 ± 89,99	<b>0,001</b>
	5-HIAA	528,96 ± 28,35	659,64 ± 26,71	0,100
<i>IND<sub>total</sub></i>	1572,74 ± 87,80	2192,11 ± 108,06	<b>0,003</b>	
Núcleo estriado	NA	1568,22 ± 121,26	1931,11 ± 122,93	0,170
	L-DOPA	329,32 ± 20,42	300,64 ± 17,18	0,669
	DA	9789,16 ± 235,76	8555,41 ± 149,35	<b>&lt; 0,001</b>
	DOPAC	1761,72 ± 48,82	1721,06 ± 56,96	0,802
	HVA	6497,82 ± 211,32	6199,65 ± 242,90	0,615
	<i>DA<sub>total</sub></i>	18445,53 ± 430,63	17179,41 ± 381,53	0,240
	5-HT	327,89 ± 10,81	278,46 ± 11,19	<b>0,003</b>
	5-HIAA	144,58 ± 4,40	138,86 ± 4,75	0,592
<i>IND<sub>total</sub></i>	472,46 ± 12,49	417,32 ± 12,62	<b>0,012</b>	

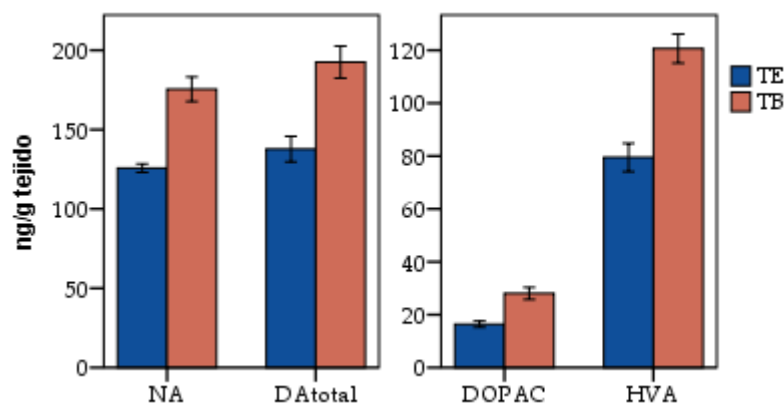
*P* valor < 0,05 marcado en negrita (n = 44).

En la **amígdala** hubo diferencias significativas en la vía de las catecolaminas, siendo los niveles de **NA** (*P* = 0,040), **DA** (*P* = 0,026) y sus metabolitos (DOPAC *P* = 0,001 y HVA *P* = 0,047), así como el *DA<sub>total</sub>* (*P* = 0,008) mayores en los animales estabulados en un ambiente empobrecido.



**Figura 37.** Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en la amígdala. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los dos grupos de estudio TE o tratamiento enriquecido y TB o tratamiento empobrecido.

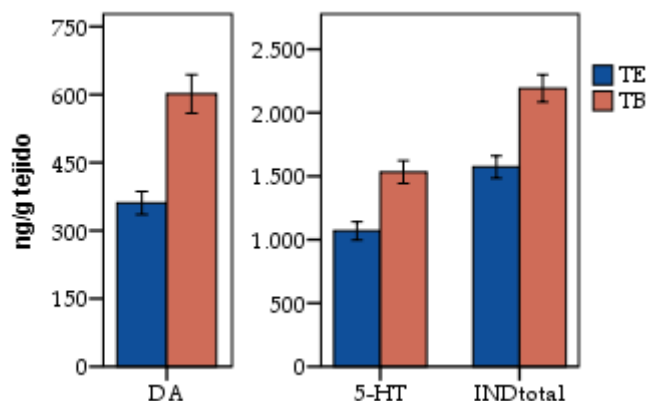
En la **PFC**, los niveles de **NA** ( $P = 0,020$ ) y de los metabolitos de la vía de degradación de la **DA**, el **DOPAC** ( $P = 0,009$ ) y el **HVA** ( $P = 0,021$ ), así como el nivel total de la vía dopaminérgica **DAtotal** ( $P = 0,040$ ) fueron mayores en los animales alojados en un ambiente empobrecido.



**Figura 38.** Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en la PFC. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los dos grupos de estudio TE o tratamiento enriquecido y TB o tratamiento empobrecido.

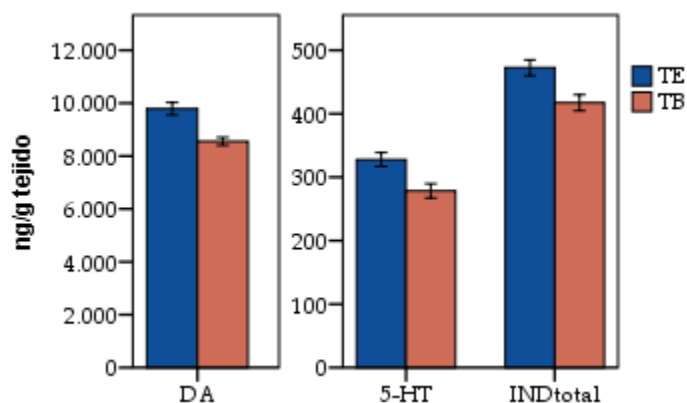
En el **hipocampo** solo se observó una tendencia a niveles mayores de **DA** en los animales establecidos en un entorno empobrecido ( $P = 0,085$ ).

En el **hipotálamo**, el grupo de animales establecidos en un entorno empobrecido mostró niveles mayores de **5-HT** ( $P = 0,001$ ) e **INDtotal** ( $P = 0,003$ ) y una tendencia a mayor concentración de **DA** ( $P = 0,054$ ).



**Figura 39.** Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en el hipotálamo. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los dos grupos de estudio TE o tratamiento enriquecido y TB o tratamiento empobrecido.

En el **núcleo estriado**, en cambio, los niveles de **DA** ( $P < 0,001$ ), de **5-HT** ( $P = 0,003$ ) y de **INDtotal** ( $P = 0,011$ ) fueron significativamente menores en los animales alojados en condiciones empobrecidas.



**Figura 40.** Representación gráfica de las diferencias significativas para el efecto del tratamiento en el núcleo estriado. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los dos grupos de estudio TE o tratamiento enriquecido y TB o tratamiento empobrecido.

## 6. Marcadores moleculares de estrés en la PFC y el hipocampo: c-Fos, ERK1/2 yBDNF

El efecto del entorno sobre dos marcadores de estrés, c-Fos y ERK1/2, fue analizada a nivel de proteína en la PFC y el hipocampo por *western blot* y densitometría. Los resultados de c-Fos y ERK1/2 son presentados como *ratios* entre el valor de absorbancia (AU) de la banda correspondiente a la proteína de estudio y el valor de absorbancia de la banda de  $\beta$ -actina. Además se realizó una corrección mediante la muestra repetida en todos los gels para corregir la variabilidad intergel.

En el hipocampo también se determinó la concentración de BDNF. Los resultados son mostrados en la Tabla 35.

**Tabla 35.** Niveles de expresión de c-Fos, ERK1/2 y BDNF en la PFC y el hipocampo para el cuarto capítulo.

	Parámetro	Alojamiento		P valor
		Enriquecido (TE)	Empobrecido (TB)	
PFC	c-Fos	0,64 ± 0,06	0,71 ± 0,08	0,714
	ERK1/2	0,82 ± 0,12	0,59 ± 0,05	0,097
Hipocampo	c-Fos	0,86 ± 0,09	1,02 ± 0,07	0,468
	ERK1/2	0,74 ± 0,11	0,89 ± 0,08	0,440
	BDNF	21,34 ± 0,65	20,29 ± 0,67	0,553

Expresado como media ± SE según el tratamiento y los P valores correspondientes.

No hubo ninguna diferencia significativa en ninguno de los marcadores estudiados entre los grupos de estudio, ni en la PFC ni en el hipocampo.

## 7. Análisis del efecto del entorno en el proteoma del hipocampo mediante iTRAQ

Para identificar las proteínas diferencialmente expresadas en el hipocampo entre las dos condiciones de estudio se realizó llevó a cabo un experimento proteómico de cuantificación relativa mediante iTRAQ (ver Material y Métodos, apartado 8).

Se utilizaron 40 muestras del estudio (20 de cada condición) y un control que consistió en un *pool* de estas 40 muestras.

Para el procesamiento de todas las muestras, así como de los controles, se realizaron 6 experimentos iTRAQ. Las muestras se marcaron según la Tabla 36, para asegurar aleatoriedad en el marcaje y evitar el posible sesgo introducido por los diferentes *reporter ions*.

**Tabla 36.** Diseño experimental del iTRAQ. 6 experimentos con 8 marcajes diferenciales para un total de 40 muestras y 1 control dispuestos aleatoriamente. Las muestras TE (tratamiento enriquecido) y TB (tratamiento empobrecidos).

Experimento	Reporter ion							
	113	114	115	116	117	118	119	121
1	TE8	TB1	TE17	TB18	TE11	TE4	Control	Control
2	TE12	TB12	TE1	TB6	TB10	TB15	TE16	Control
3	TB13	TE18	TB5	TE6	TB14	TB2	TE7	Control
4	TB7	TE3	TB17	TE15	TE9	TE14	TB16	Control
5	TE20	TB20	TB8	TE10	TB19	TE13	TB4	Control
6	TB11	TE2	TE19	TB3	TE5	Control	TB9	Control



Se obtuvieron 63097 patrones de fragmentación peptídica correspondientes a 15649 péptidos que a su vez correspondían a 2418 proteínas identificadas en la especie porcina. Las proteínas no caracterizadas fueron anotadas por homología (> 98 %) con las secuencias de proteínas de otros mamíferos.

La intensidad de marcaje de cada péptido fue normalizada según lo descrito en el apartado de Material y Métodos (apartado 8.6). La cuantificación de las proteínas se obtuvo de la suma de las intensidades de los péptidos anteriores, que a su vez fue normalizada y se calculó la ratio de intensidad de cada proteína entre cada condición (*fold change*, FC).

Después del pre-procesado de las muestras, 2304 proteínas pudieron ser cuantificadas y comparadas entre los dos grupos de estudio. Se encontraron 59 proteínas diferenciales establecidas con un *P* valor ajustado menor de 0,05 y un *fold change* menor que 0,8 (*down*) o mayor que 1,25 (*up*):

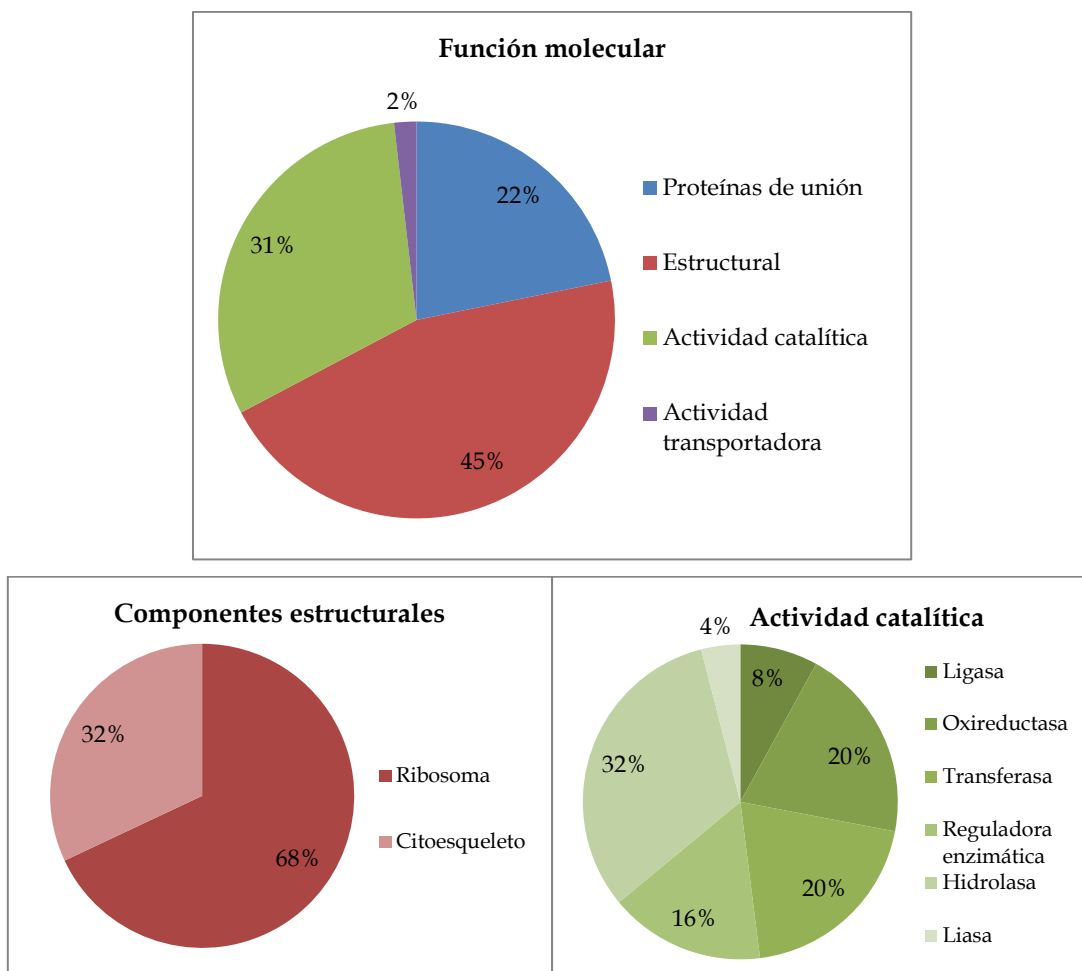
**Tabla 37.** Listado de proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ. Identificación en Uniprot, nombre de la proteína, cambio diferencial entre TE y TB (FC) y sentido del cambio en TE respecto a TB.

Acceso Uniprot	Identificación	FC E vs B
A0A0B8RT95	Proteína ribosomal L4	1,504 <i>up</i>
A1XQU3	Proteína ribosomal L14	1,549 <i>up</i>
A1XQU9	Proteína ribosomal S20	1,658 <i>up</i>
B0FWK5	Proteína ribosomal L5	1,576 <i>up</i>
F1RQ91	Proteína ribosomal S4	1,54 <i>up</i>
F1S2E5	Proteína ribosomal S24	1,814 <i>up</i>
F1SEG5	Proteína ribosomal S16	1,72 <i>up</i>
F2Z512	Proteína ribosomal S23	1,489 <i>up</i>
F2Z522	Proteína ribosomal L23a	1,693 <i>up</i>
F2Z5G8	Proteína ribosomal S25	1,591 <i>up</i>
F2Z5Q6	Proteína ribosomal S6	1,577 <i>up</i>
I3L5B2	Proteína ribosomal S7	1,474 <i>up</i>
I3L6F1	Proteína ribosomal L18	1,657 <i>up</i>
I3LBH4	Proteína ribosomal L12	1,454 <i>up</i>
I3LJ87	Proteína ribosomal S2	1,438 <i>up</i>
P46405	Proteína ribosomal S12	1,601 <i>up</i>
P62901	Proteína ribosomal L31	1,719 <i>up</i>
P67985	Proteína ribosomal L22	1,616 <i>up</i>
Q29194	Proteína ribosomal S2 (fragmento)	1,649 <i>up</i>
Q4GWZ2	Proteína ribosomal SA	1,943 <i>up</i>
Q6QAS9	Proteína ribosomal L7 (fragmento)	1,928 <i>up</i>
Q95281	Proteína ribosomal L29	1,766 <i>up</i>
F1RGD9	Histidina-tRNA ligasa	0,732 <i>down</i>
I3L8P7	Fenilalanina-tRNA ligasa	1,33 <i>up</i>
I3LSU1	Proteína sin dominio POU de unión a octámeros	1,419 <i>up</i>
I3LCN6	Activador transcripcional Pur-alpha	1,334 <i>up</i>
F1SNK9	Proteína ELAV-like	1,814 <i>up</i>
I3LUP6	Nucleofosmina	1,537 <i>up</i>
F1S6M7	Tubulina beta-3	1,397 <i>up</i>

F2Z571	Tubulins beta-4B	1,611	up
F2Z5K5	Tubulina beta-4A	1,437	up
F2Z5S8	Tubulina alpha-4A	1,437	up
P02550	Tubulina alpha-1A chain	1,402	up
P02554	Tubulina beta	1,398	up
Q2HPK3	Tubulina alpha-3	1,526	up
F1SSA6	Miosina 10	1,426	up
I3LNV3	Isoforma 4 de Miosina 18	2,47	up
P04574	Subunidad pequeña de calpaína 1	1,344	up
F1RFF5	NipSnap	1,505	up
F1RG61	Proteína 10B de familia de dominio TBC1	1,421	up
F1RQS8	Proteína de ribosilación-ADP factor-like 2	0,691	down
F1SIS9	NADH deshidrogenasa 1, subcomplejo alpha subunidad 10	1,505	up
F1SL07	NADH deshidrogenasa 1, subcomplejo alpha subunidad 9	1,392	up
I3LDC1	Succinato deshidrogenasa	1,439	up
I3LQ34	TOM70-receptor mitocondrial	1,668	up
A0A0B8RTH9	Lisofosfolipasa I	0,524	down
A8U4R4	Transcetolasa	0,79	down
I3L656	ADP-ribosa pirofosfatasa	0,681	down
F1RWM4	Subunidad reguladora de proteina fosfatasa 1	1,923	up
F1SB62	Acetil-CoA acetiltransferasa	0,721	down
F1SEN4	Factor regulador de adipogénesis	0,679	down
F1SUH8	ATPasa H+ tipo V	0,466	down
K7GQV5	Maleilacetoacetato isomerasa	0,746	down
P63246	Receptor 1 de la proteina quinasa C activada	1,509	up
I3LEH4	Monoamina oxidasa A	1,465	up
I3LKS6	Dihidropteridina reductasa	0,787	down

El análisis bioinformático de las proteínas diferencialmente expresadas entre las dos condiciones de estudio se llevó a cabo mediante 3 procedimientos.

En primer lugar, mediante el software PANTHER (<http://panther.db>; University of Southern California) se obtuvo la clasificación GO (Gene Ontology) que agrupó a las proteínas de la tabla anterior según su función molecular. Esta anotación clasificó las 59 proteínas diferenciales en 4 grupos funcionales que se representan en la Figura 41: **(A) Proteínas de unión** (GO: 0005488) que incluye 12 de las proteínas identificadas y representa varias funciones como: unión a antígeno (GO:0003823), a ácidos nucleicos (GO:0003676) y a otras proteínas (GO:0005515); **(B) Proteínas con actividad catalítica** (GO:0003824) que incluye 17 de las proteínas identificadas y representa actividades como hidrolasas (GO:0016787), ligasas (GO:0016874), liasas (GO:0016829), oxidoreductasas (GO:0016491), transferasas (GO:0016740) o la regulación enzimática (GO:0030234); **(C) Proteínas con función estructural** (GO:0005198) que incluye 25 de las proteínas identificadas y representa a proteínas estructurales del ribosoma (GO:0003735) y de citoesqueleto (GO:0005200); y **(D) actividad transportadora** (GO:0005215) con una sola proteína.

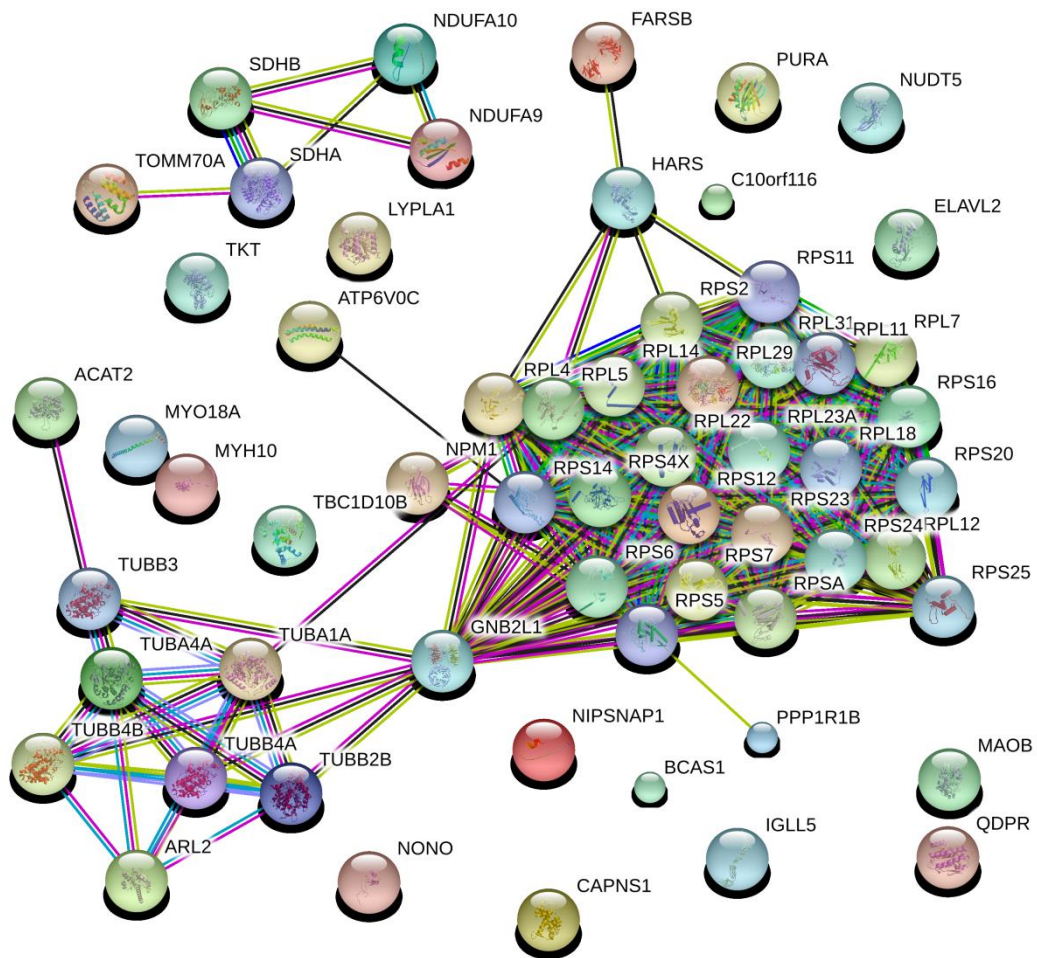


**Figura 41.** Representación gráfica del análisis de términos Gene Ontology (GO) de las proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ. Arriba la clasificación general según función molecular y abajo los dos subgrupos más destacados: componentes estructurales y actividad catalítica.

En segundo lugar, para la integración del análisis de los términos GO y comprender su interacción y sus vías comunes de función, se realizó un análisis de *pathway* utilizando la herramienta de búsqueda y representación gráfica de *pathways* “KEGG Mapper” del Centro Bioinformático de la Universidad de Kyoto basado en la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG).

Se encontraron destacados los *pathways* de ribosoma o traducción génica con 21 de las proteínas diferenciales involucradas; vías metabólicas con 9 proteínas y el fagosoma o uniones gap con 7.

Para la visualización gráfica de estas interacciones se utilizó la herramienta STRING (<http://string-db.org>), que incluye las predicciones de interacciones provenientes de distintas fuentes indicadas en el pie de la Figura 42.



**Figura 42.** Representación gráfica de las interacciones entre las proteínas diferenciales identificadas por iTRAQ en el cuarto estudio. Los nodos representan a las proteínas identificadas y las líneas representan asociaciones provenientes de distintas fuentes: azul de bases de datos, rosa determinadas experimentalmente, verde oscuro predicciones por cercanía de los genes, amarillo por aparición en documentos, negro por coexpresión y gris por homología a otras proteínas.



# DISCUSIÓN



# DISCUSIÓN

Debido al incremento de consumo de carne de cerdo, la industria productora ha tendido a la reducción de costes y el aumento de productividad. En muchos casos esto ha conllevado a la pérdida de bienestar animal, y una visión negativa por parte del consumidor, que aparte de valorar la calidad de la carne, también valora la calidad de vida de los animales (Millet, Moons, Oeckel, et al., 2005; Ngapo et al., 2003). Esta preocupación por el bienestar animal ha ido en aumento, y la legislación ha ido avanzando de su mano. En 1992 el Farm Animal Welfare Council definió una serie de reglas para garantizar el bienestar de los animales de cría, y en 2012, los 178 miembros de la organización mundial por la salud animal ((OIE) 2012), definió los 10 principios generales de bienestar de animales en sistemas de producción para establecer unos mínimos en las condiciones de cría, alojamiento, transporte y sacrificio que garantice un bienestar animal aceptable (Council, 1992).

Los sistemas de producción porcina actuales conllevan a someter a los animales a numerosos factores estresantes a lo largo de su vida, desde aquellos debidos a restricciones alimentarias, a condiciones ambientales adversas o al manejo poco cuidadoso. Por este motivo, se ha trabajado en la mejora en las condiciones de alojamiento para producir un efecto positivo en el bienestar animal. La industria productora porcina ha cambiado de los sistemas tradicionales de alojamiento en que los animales pastaban libremente, a explotaciones intensivas en las que los animales se alojan en espacios cerrados, reducidos y empobrecidos, lo que imposibilita la expresión de la conducta específica de la especie. Actualmente, se han comenzado a valorar otros sistemas de cría que Por este motivo se han comenzado a valorar otros sistemas de cría que combinen sistemas intensivos con pasturas exteriores, granjas ecológicas o facilitar entornos enriquecidos a los animales (Millet, Moons, Oeckel, et al., 2005; Weerd & Day, 2009).

Las metodologías más usadas para medir el estrés y bienestar animal son observaciones conductuales y biomarcadores que se ven alterados en la respuesta a estrés (Martínez-Miró et al., 2016). Los marcadores más medidos en estudios de estrés y/o bienestar animal son los GC, las catecolaminas, las APP, marcadores del metabolismo energético, marcadores musculares y marcadores de estrés oxidativo. Aunque son ampliamente utilizados todos tienen sus limitaciones, y sin embargo no existe ningún criterio suficientemente objetivo ni específico para evaluar el grado de estrés.

Por otro lado, el control de la respuesta al estrés se lleva a cabo en el SNC. Según la neurología clásica, las vías neuronales que controlan la respuesta al estrés, miedo, agresión,



emoción y otras conductas incumben regiones cerebrales específicas como la amígdala, el hipocampo o la PFC. Procesan información para organizar la respuesta autónoma tanto a estímulos externos como internos, y especialmente están involucradas en el control de la respuesta al estrés por la regulación del eje HPA (Albert et al., 2014; Antoniadis & McDonald, 2000; Asan, Steinke, & Lesch, 2013; Belujon & Grace, 2011; Tovote et al., 2015; Vermetten & Bremner, 2002).

Aunque tradicionalmente el sistema noradrenérgico en el LC ha tenido mucha relación con esta respuesta, los tres sistemas de NT evaluados en este trabajo (noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico) tienen un papel importante en el control de la respuesta al estrés (Belujon & Grace, 2015; Kandel et al., 2013).

Las distintas condiciones de alojamiento, estrés y/o características de los cerdos y su reflejo en la bioquímica del suero y de regiones del SNC estudiadas en este trabajo son:

- **Capítulo 1:** estudio del efecto del gen halotano y del sexo en el sacrificio.
- **Capítulo 2:** estrés por manejo y fenotipo miedoso.
- **Capítulo 3:** condiciones de alojamiento y estrés por transporte;
- **Capítulo 4:** enriquecimiento ambiental (EE).

Además, cabe destacar que este trabajo forma parte de un proyecto coordinado (AGL2011-30598-C03-02) en el que aparte de las medidas bioquímicas se realizaron medidas conductuales. Para ello se desarrolló un test (test del sesgo cognitivo) para evaluar el estado emocional de los animales (Carreras et al., 2015) conjuntamente con otras medidas conductuales de bienestar, que fueron relacionadas con parámetros de calidad de la carne y marcadores de estrés en suero en estos dos estudios.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en suero y los obtenidos en SNC de forma separada para lograr una mejor integración entre los 4 estudios.

## **1. Perfil bioquímico en el suero**

Para el análisis de los perfiles bioquímicos según las condiciones de los distintos estudios, se han realizado dos análisis estadísticos distintos. Por un lado en el capítulo 1 (sexo y susceptibilidad al estrés) y del capítulo 4 (EE) se obtuvieron muestras sanguíneas a lo largo de la vida de los cerdos, por lo que el análisis estadístico permite comparar los niveles de los parámetros bioquímicos en el suero en el momento del sacrificio con los niveles basales, excepto para la NA y la A en el capítulo 4.

Por otro lado, para el capítulo 2 (estrés por manejo y fenotipo miedoso) y el 3 (alojamiento exterior y estrés por transporte), únicamente se obtuvieron muestras en el momento del sacrificio, por lo que la comparación se realiza únicamente entre grupos de estudio.

La respuesta al estrés produce la activación de los ejes SAM y HPA que provocan la liberación de catecolaminas, noradrenalina (NA) y adrenalina (A), y GC, respectivamente, siendo el cortisol el más importante en cerdos, a la circulación sanguínea (Smith & Vale, 2006).

El sacrificio es conocido por ser un factor causante de estrés en cerdos, con múltiples orígenes como son el transporte, la privación de agua y comida, cambios en el entorno y el estrés social por mezcla de grupos. En el capítulo 1, se ve un claro incremento de la concentración de **cortisol** en suero el **sacrificio** respecto a los niveles basales. Aunque las condiciones experimentales en el transporte y manejo en el matadero fueron muy similares, este incremento de cortisol no se vio en los animales del cuarto estudio. Pese a que el cortisol plasmático es el parámetro más utilizado para valorar el estrés y bienestar en la especie porcina, hay gran controversia en cuanto a su reproducibilidad (Grandin, 1997). La gran variabilidad en el suero de esta hormona es el motivo principal por el que no se le considera un buen marcador de estrés (Mormède et al., 2007) y por ello se ha propuesto su determinación en muestras de otro origen, como en saliva, heces y pelo (Russell et al., 2012; Sheriff et al., 2010). En el capítulo 3 se analizaron los niveles de cortisol en saliva, pero no se observó ninguna diferencia entre tratamientos en el alojamiento ni en el transporte al matadero, posiblemente enmascarado por el propio estrés agudo que causa el sacrificio.

Por otro lado, las condiciones de **TE** (tratamiento **enriquecido**) causan una reducción de aproximadamente un 35% en los niveles de **cortisol** sérico respecto a la condición **TB** (tratamiento **empobrecido**). Por otro lado, las condiciones de **EE** producen reducción en los niveles de **cortisol** sérico producido por un tratamiento enriquecido. En la literatura existen resultados contradictorios evaluando los niveles de cortisol en distintas condiciones de **EE**, mientras que algunos estudios apoyan que el **EE** reduce los niveles de **GC** tanto basales como tras ser expuestos a un factor estresante, otros afirman que no hay diferencias según las condiciones de alojamiento, y hay otra corriente que afirma que el **EE** crea una situación fisiológica similar a la producida por el estrés crónico, manteniendo, entre otras cosas, unos niveles de **GC** basales superiores (Fox, Merali, & Harrison, 2006).

Por otro lado, las **catecolaminas en suero** fueron medidas únicamente en la muestra tomada en el matadero, por lo que no se pudo comparar con sus niveles basales. En el experimento de **EE** no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos excepto una tendencia para el caso de la **A**, que es más alta en el grupo de animales en **TB**, lo que sugiere

que estos animales pueden sufrir más el efecto estresante del sacrificio. En el estudio del capítulo 3 (**alojamiento ID/OD y transporte TC/TL**) se observa una interacción para la **NA** entre los dos tratamientos, sugiriendo que el alojamiento **OD** puede causar una disminución de **NA** y por tanto indicar que los individuos están menos estresados, pero que estos sufren más el transporte largo puesto que el aumento de **NA** en estas condiciones es mayor en este grupo que en el grupo **ID**.

A causa de la acción del cortisol y las catecolaminas se da mayor movilización y catabolismo de las reservas energéticas, estimulando la glucogenolisis y la lipólisis, e inhibiendo la captación de glucosa en tejidos no relacionados con la respuesta al estrés (Black, 2002; Romero & Butler, 2007), hecho que conlleva a una mayor presencia de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y glucosa, entre otros, en el suero. El aumento de cortisol causado por el estrés en el **sacrificio** en el capítulo 1, va acompañado de mayor concentración en el suero de **glucosa** y **triglicéridos**. Además, este incremento del metabolismo energético fue mayor en hembras que en machos, indicando la movilización energética para hacer frente al estrés en el matadero (Black, 2002) y sugiriendo una mayor susceptibilidad y/o respuesta a estrés en las hembras.

En el capítulo 4 se observa una mayor concentración de **lactato** tras el **sacrificio**, coherente con la utilización de la glucosa por la vía glucolítica, así como una disminución significativa en la concentración de colesterol por efecto del sacrificio, sin embargo las diferencias son mínimas en términos de implicación biológica.

En cuanto al efecto del **EE**, en sinergia con la disminución de cortisol tras el tratamiento en el grupo **TE**, también se observa la reducción en las concentraciones de **lactato**, que estaría indicando posiblemente un mejor aprovechamiento de la glucosa.

Por otro lado, el estrés también desencadena una respuesta inflamatoria, mediante los GC y las catecolaminas que activan la producción de citoquinas y la respuesta de fase aguda caracterizada por cambios en los niveles de las proteínas de fase aguda (**APP**) (Black 2002). En cerdo las **APP** mayoritarias son la Pig-MAP, la proteína C-reactiva (**CRP**) y la haptoglobina (**Hp**). Estas son **APPs** positivas, de manera aumentan en la respuesta de fase aguda, siendo tanto aceptados tanto como marcadores de infección o inflamación, como de estrés (A Marco-Ramell et al., 2011; Petersen, Nielsen, & Heegaardb, 2004; M. Piñeiro et al., 2007; Y Saco et al., 2003; Salamano et al., 2008). Se debe tener en cuenta que las concentraciones séricas de estas **APP** se encuentran dentro de los intervalos de referencia establecidos en cerdo (C. Piñeiro et al., 2009), por lo que se descartan procesos inflamatorios en estos animales.

La concentración en suero de **CRP** aumenta en el **sacrificio** respecto al nivel basal, y también es mayor en Nn que en NN, ambos en el estudio del capítulo 1, indicando cierto grado de estrés y pérdida de bienestar debido al estrés en el matadero y al **genotipo** susceptible al estrés

Estudios anteriores han descrito incrementos en la **Hp** relacionados con estrés (Salamano et al., 2008), por lo que el hecho de que los animales con acceso al **exterior** muestren concentraciones de Hp en suero menores que los alojados únicamente en el interior, sugiere que esta combinación de condiciones de alojamiento contribuye a la mejora del grado de bienestar.

Por otro lado, los niveles de **CRP** y de **Hp** fueron mayores en **hembras** que en machos, mientras que los niveles de **Pig-MAP** en condiciones basales son ligeramente mayores en machos, como ya está descrito para algunas APP (C. Piñeiro et al., 2009). De hecho, la Pig-MAP tuvo un comportamiento muy diferencial ante el estrés sufrido en el sacrificio, mostrando una evolución completamente opuesta entre sexos.

No obstante cabe destacar que para la síntesis de proteínas se requiere más tiempo del que duraron los posibles factores causantes de estrés agudo, como el sacrificio. Por estos motivos, las ligeras diferencias observadas en las concentraciones de APP debidas al efecto del sacrificio no tendrían relevancia biológica.

Paralelamente, los estresores físicos pueden producir daño muscular. Uno de los marcadores utilizados como indicador de daño muscular es la actividad en suero de la **creatina quinasa** (CK). En los animales sometidos a un **transporte** largo por carretera, también se observan mayores niveles de **CK** respecto a aquellos transportados en un trayecto corto, indicando un mayor número de lesiones causado por un trayecto largo y por una carretera de montaña.

En el estudio de EE se observó una evolución diferencial de los niveles de CK a lo largo del **tiempo**. Los niveles de actividad de la **CK** disminuyen entre la primera y la segunda toma de muestra, probablemente indicando la adaptación de los animales al entorno. Entre la segunda muestra y el sacrificio se observa un incremento debido al estrés físico sufrido. En cambio, en el estudio del capítulo 1 se describió una disminución de los niveles de **CK** tras el **sacrificio**. Sin embargo, como sucede con las APP, en todos los casos las actividades de la CK son muy bajas restando importancia biológica a las diferencias significativas. En el estudio 1 también se vieron diferencias entre **genotipos**, teniendo niveles mayores de CK los animales portadores del gen halotano, Nn, lo que sugiere cierta susceptibilidad al estrés. Estudios previos habían mostrado también un nivel mayor de CK en el suero de los Nn que en los NN, pese a no expresar un fenotipo susceptible al estrés como muestran los homocigotos recesivos nn (Adeola, Ball, House, & O'Brien, 1993).

Por otro lado, el incremento del metabolismo energético propicia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo es causado por una disrupción del equilibrio oxidativo, causado bien por el incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS) a causa del aumento del catabolismo o por la pérdida de moléculas antioxidantes (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). En el último capítulo se determinaron en suero dos marcadores de **estrés oxidativo**, la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). Estas dos enzimas están relacionadas con mecanismos antioxidantes: la **SOD** cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, y la **GPx** detoxifica estos peróxidos de hidrógeno. La actividad GPx incrementa a lo largo de los dos meses de **tratamiento** para los dos grupos, mientras que la SOD no varía. Después del **sacrificio**, se observa un incremento moderado de GPx y un incremento muy notable de la SOD, independientemente del tratamiento aplicado. Resultaría interesante determinar la presencia de ROS para poder establecer si hay una disrupción del equilibrio oxidativo, ya que la mayor actividad de estas enzimas antioxidantes podría ser causada por el incremento en la formación de ROS y la necesidad de restablecer dicho equilibrio (Frijhoff et al., 2015). Es interesante comentar también la correlación positiva que existe entre ambos parámetros (Tabla 33).

## 2. Perfil en el SNC

En el SNC se analizaron las concentraciones de NT monoaminérgicos en amígdala, PFC, hipocampo, hipotálamo y núcleo estriado (este último solo en el capítulo 4). Además, en los capítulos 3 y 4 se determinaron otros parámetros como la expresión de c-Fos y ERK1/2, la carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica y la concentración del factor neurotrófico BDNF en algunas de las regiones, como marcadores de estrés en el tejido cerebral. Finalmente, se realizó un experimento de proteómica para determinar las proteínas expresadas diferencialmente en el hipocampo en EE.

### 2.1. Neurotransmisores monoaminérgicos

El primer objetivo fue determinar el patrón particular de NT que permite la diferenciación de las regiones incluidas en el estudio. En el primer estudio (sexo y susceptibilidad a estrés) se realizó un análisis factorial que resultó en dos componentes que permitían diferenciar las 4 regiones incluidas, amígdala, PFC, hipocampo e hipotálamo. El hipotálamo se caracteriza por niveles más altos de NA y L-DOPA que las otras regiones, y la amígdala por niveles mayores del resto de moléculas analizadas, dopamina, serotonina y sus metabolitos, que el hipocampo y la PFC. Estas dos últimas regiones son las que comparten un patrón más

similar de NT. Estas claras diferencias entre regiones se han mantenido en el resto de estudios.

### **2.1.1. Sexo y genotipo halotano**

Debido a la adquisición de la susceptibilidad al estrés por la mutación en el gen de la rianodina, y su importancia en la regulación de los niveles de calcio intracelulares, se planteó la posibilidad de que ello conllevará a cambios en los niveles de NT en cerebro. Sin embargo, en los cerdos del estudio del capítulo 1, no se observó ninguna diferencia en los niveles de NT en las 4 regiones de estudio según su sexo ni la susceptibilidad a estrés que pudiera conceder el gen de la rianodina.

Muy pocos estudios se han llevado a cabo en cerdos con el genotipo halotano y sus niveles de NT. Adeola, describió niveles de 5-HT menores en el hipotálamo e hipocampo de nn que de NN. Para las catecolaminas observaron niveles menores de DA y NA en el hipotálamo de los animales nn que en los NN, y para el hipocampo únicamente la NA, también menor en los nn. Sin embargo, las diferencias entre los heterocigotos (Nn) y los homocigotos libres para la mutación (NN) fueron menores, describiendo únicamente niveles menores de 5-HT en el hipocampo de los heterocigotos (Adeola et al., 1993). Posiblemente si se hubieran utilizado individuos homocigotos nn en nuestro estudio hubiésemos podido identificar diferencias, ya que los heterocigotos Nn son solo portadores de la mutación. Sin embargo, desde hace años que los individuos nn se están retirando de la reproducción por lo que el interés en analizar los nn es bajo.

Debido a las pocas diferencias obtenidas en el análisis univariante, se realizó un análisis factorial para intentar reducir las numerosas variables estudiadas a menos factores que pudieran explicar efectos del sexo o el genotipo halotano. De este análisis factorial se observó una tendencia a niveles menores de NA, DA y 5-HT en la amígdala, de NA en la PFC y mayores de las APP, Hp y CRP en los animales Nn. El sexo no afecta a los NTs y, como ya se predijo en el análisis univariante, está definido por niveles mayores de los marcadores del metabolismo energético en las hembras en el momento del sacrificio.

Como se ha comentado, este estudio estaba integrado dentro de un proyecto coordinado que evaluaba el estado afectivo de los animales. Cabe destacar que en el primer estudio no se observaron cambios en las medidas de comportamiento debidas al sexo ni al genotipo (Carreras, Arroyo, et al., 2016), sugiriendo que estas variables no tienen efecto en las características emocionales de los animales, y por lo tanto no generarían una habilidad diferencial para hacer frente al estrés en el matadero.

### 2.1.2. Estrés por manejo en el matadero

Los cambios más remarcables inducidos por un manejo estresante en el sacrificio fueron la alteración del sistema serotoninérgico en el hipocampo y la amígdala, sugiriendo un papel central del sistema serotoninérgico en la regulación del estrés agudo. La serotonina tiene un efecto modulador en muchas funciones integrativas del SNC, como el estrés, el humor, la ansiedad o la agresión (Olivier, 2015) y ha sido reconocido por su relación directa con el estrés por ser una pieza reguladora del eje HPA (Lanfumey, Mongeau, Cohen-Salmon, & Hamon, 2008). Cambios en los niveles de 5-HT han sido relacionados con la actividad del eje HPA en roedores y humanos (Dinan, 1996). Particularmente, incrementos en la síntesis y liberación de 5-HT han sido observados en varias áreas en respuesta a diferentes condiciones estresantes como choques eléctricos, inmovilización o pinchazos en la cola en rata (Lanfumey et al., 2008).

En el estudio, se observa una disminución de la vía de la **5-HT** en la **amígdala** después del **estrés** agudo por **manejo**. En la bibliografía se han descrito resultados contradictorios probablemente debido a la región-especificidad de la amígdala (Asan et al., 2013), y a la controversia existente en el papel de la 5-HT en la respuesta a estrés ya que no hay consenso sobre si su acción es excitatoria o inhibitoria (Bland et al., 2003; Maier & Watkins, 2005). Niveles bajos de 5-HT en la amígdala han sido mostrados en ratas sometidas a estrés agudo actuando de manera preventiva ante el efecto ansiogénico del estrés (Kirby, Allen, & Lucki, 1995). Por otro lado, se ha descrito que los niveles de 5-HT en los núcleos del rafe y en la amígdala son inversamente proporcionales a la reactividad de la amígdala asociada a estímulos emocionales negativos, ya que las proyecciones de 5-HT a la amígdala son conocidas por tener efecto inhibitorio (Ressler & Nemeroff, 2000).

Por lo tanto, los niveles reducidos de 5-HT en la amígdala en este estudio indicarían una alta reactividad de esta región ante un estímulo negativo como es el manejo brusco previo al sacrificio.

Contrariamente, en el **hipocampo** se observó una tendencia a incrementar los niveles de **5-HT** y de su metabolito **5-HIAA** inducido por el **manejo** estresante en el matadero, indicando la liberación y metabolización de la 5-HT en esta región.

El hipocampo recibe densas proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe, contiene amplias cantidades de receptores de 5-HT y además se ha descrito su papel mediador entre 5-HT y control del eje HPA (Lanfumey et al., 2008; Vermetten & Bremner, 2002).

Esto concuerda con numerosos estudios en roedores que han demostrado la liberación de 5-HT en el hipocampo durante condiciones de estrés como inmovilización (Vahabzadeh & Fillenz, 1994), estrés psicológico (Matsuo, Kataoka, Mataka, Kato, & Oi, 1996), exposición a

depredador o nado forzado (Rueter & Jacobs, 1996) o choque eléctrico (Hajós-Korcsok et al., 2003).

En el **hipotálamo** se encontró mayor concentración de los metabolitos de la **DA**, indicando un alto metabolismo en la vía dopaminérgica, y por lo tanto que el sistema dopaminérgico también es activado por la respuesta al estrés como ya se ha sugerido en otras ocasiones (Belujon & Grace, 2015). En contraste con otros trabajos, en este estudio no se detectaron cambios en los niveles de NA en el hipotálamo (Adeola et al., 1993; Belujon & Grace, 2011; Piekarczywska, Rosochacki, & Sender, 2000).

Cabe destacar que el manejo estresante al que fueron sometidos los animales fue muy suave y en el momento de la realización no se observaron conductas asociadas al estrés.

El segundo objetivo de este estudio, fue evaluar si los animales clasificados como miedosos según el TI afrontaban el estrés de manera diferente que los no miedosos.

Ante una situación de manejo control, no hubo diferencias en los niveles de NT entre los animales con fenotipo miedoso y fenotipo no-miedoso. En cambio, ante una situación estresante la vía serotoninérgica se vio incrementada en el hipocampo de los animales **miedosos**. Variaciones en la presencia de **5-HT** ha sido relacionada con conducta miedosa en cerdos, concretamente se ha correlacionado positivamente los niveles de 5-HT en el hipocampo con el estado de alerta o *freezing* (alto nivel de miedo) y negativamente con la conducta exploradora, que indica bajos niveles de miedo y/o ansiedad (Ursinus et al., 2013). En otras especies también se han observado cambios en la misma dirección. El estrés agudo en ratas ha sido relacionado con incrementos de 5-HT y también con el *freezing* y otras conductas asociadas con la ansiedad (Hajós-Korcsok et al., 2003), y la supresión genética del receptor de 5-HT tipo 1A en ratones ha sido relacionado con fenotipos más miedosos, sugiriendo de nuevo su relación con la modulación de la ansiedad (Albert et al., 2014).

En el hipocampo también se observaron niveles ligeramente superiores de **catecolaminas**, estando relacionado con el condicionamiento y respuesta a estímulos adversos (Ressler & Nemeroff, 2000).

Teniendo en cuenta esto, los resultados sugieren que el hipocampo, pero no otras regiones, está involucrado en la medida individual relativa al miedo y que la 5-HT sería el neurotransmisor principal involucrado.

Cabe destacar que la metodología de estos estudios permite medir la cantidad total de NT, no es posible conocer la cantidad extracelular de NT que es la que estaría actuando directamente en la sinapsis.



### 2.1.3. Alojamiento y estrés por transporte

En el SNC la vía mayoritaria que reaccionó ante cambios en las condiciones de **alojamiento** fue el sistema **dopaminérgico** en la PFC. La DA es conocida por su papel principal en procesos de adicción y recompensa. Niveles bajos están asociados con conductas impulsivas y niveles elevados con el placer y el bienestar general (Blum et al., 2012; Rutledge, Skandali, Dayan, & Dolan, 2015), de hecho, una elevada neurotransmisión dopaminérgica en la PFC ha sido descrita en ratas en un entorno enriquecido (Zhu, Apparsundaram, Bardo, & Dwoskin, 2005). En nuestro estudio, los animales alojados en el exterior mostraron concentraciones notablemente superiores que los alojados en el interior, sugiriendo un mayor bienestar.

La vía serotoninérgica, en cambio, fue afectada levemente, siendo los niveles de 5-HIAA, el metabolito de degradación de la 5-HT, mayores en la PFC y menores en el hipocampo de los animales alojados en el exterior. Estudios en rata también mostraron una disminución de 5-HT en el hipocampo en condiciones de EE (Galani et al., 2007). Este resultado está de acuerdo con el del apartado anterior, donde se encontraron asociados niveles altos de 5-HT en el hipocampo de los individuos con estrés.

Estos resultados sugieren que el acceso a una pastura exterior, incluso aunque solo sean 4 horas al día, incrementa el bienestar de los cerdos.

La vía **dopaminérgica** en la PFC y el hipocampo también se vio alterada según el **transporte** al matadero que sufrieron los cerdos del estudio. En ambas regiones se vieron incrementados de manera muy notable los niveles de DA y de algunos de sus metabolitos de degradación tras un transporte largo por carretera en comparación con uno corto. Como se ha comentado anteriormente, la DA es fundamental en las vías de recompensa, pero también se ha descrito su relevancia en situaciones estresantes (Joca et al., 2007a). La finalidad de este incremento de las proyecciones dopaminérgicas sería preparar al individuo para una respuesta más reactiva y así facilitar la respuesta de huida (Belujon & Grace, 2015). De hecho, los incrementos de DA en la PFC tras estímulos estresantes están asociados con el estado de alerta y conlleva a un mejor control de la locomoción y al incremento del procesamiento neuronal de la información (Vermetten & Bremner, 2002). Estos cambios también se han observado en numerosos estudios en modelos animales de laboratorio sometidos a diferentes estresores (Pezze & Feldon, 2004).

También se observó un incremento en los niveles de **NA** en la **PFC** tras un **transporte** largo por carretera. La PFC es crucial en la respuesta a estímulos estresantes, siendo activada tanto por estresores físicos como psicológicos (Belujon & Grace, 2015), como sería el caso en cerdos

transportados en camión por carretera. Estudios previos en otras especies han mostrado incrementos de NA en esta región como mediador de la respuesta al estrés, y relacionado con la respuesta del eje HPA (Douglas, 2005), y también han relacionado el incremento de NA y DA tras estímulos estresantes con discapacidades en las funciones cognitivas desarrolladas por esta región (Cabib & Puglisi-Allegra, 2012) .

La vía **serotoninérgica**, en cambio, se vio menormente afectada por el estrés por **transporte**, viéndose niveles menores de 5-HT en la **PFC** y mayores de 5-HIAA en el **hipocampo** tras el transporte largo por carretera. Como se ha comentado en el apartado anterior, se han descrito resultados contradictorios en relación al papel de la 5-HT en la respuesta a estrés (Bland et al., 2003; Maier & Watkins, 2005).

#### **2.1.4. Enriquecimiento ambiental**

El análisis de los NT en 5 áreas cerebrales (amígdala, PFC, hipocampo, hipotálamo y núcleo estriado) mostró numerosas diferencias en los niveles de NT y de sus metabolitos, pese a existir una gran variabilidad y un efecto corral importante para alguna de las variables.

La vía de transmisión más afectada fue la **dopaminérgica**. Los niveles de DA y/o de alguno de sus metabolitos fueron mayores en la **amígdala, PFC e hipotálamo** y menores en el **núcleo estriado** de los animales alojados en condiciones empobrecidas que en aquellos en un entorno enriquecido. En el **hipocampo** no hubo diferencias significativas en ninguna medida relativa a los NT. Si bien hay una diferencia clara a niveles mayores de la vía dopaminérgica en el hipocampo de los animales bajo unas condiciones empobrecidas, la restricción del análisis estadístico y el elevado efecto corral observado catalogó esta diferencia como una tendencia.

Como ya se ha comentado, están descritos numerosos estresores que conducen a un incremento de los niveles de DA en varias áreas cerebrales (Arco et al., 2007; Belujon & Grace, 2015). El hecho de que sus niveles ante una situación conocida como causante de estrés en cerdos, como es el sacrificio, sean menores en aquellos animales alojados en un entorno enriquecido, estaría indicando una mayor capacidad de hacer frente al estrés y una menor respuesta ansiogénica. Alojarse en un entorno enriquecido ha sido relacionado con una menor reactividad de la vía dopaminérgica mesocortical a estímulos estresantes (Garrido et al., 2013; Segovia et al., 2008). Se ha propuesto que en la regulación de esta vía está involucrada la amígdala, de manera que cambios producidos por EE en la amígdala puede llevar a una baja reactividad del sistema dopaminérgico, y a su vez a una mejor estrategia de respuesta al estrés (Berridge & Waterhouse, 2003; Bland et al., 2003; Garrido et al., 2013). En cuanto al núcleo estriado, diversos estudios han establecido niveles

reducidos de DA en esta región tras someter a los individuos a diferentes tipos de estrés (Ahmad, Rasheed, Banu, & Palit, 2010), por lo que los niveles reducidos de DA en el núcleo estriado de animales en un entorno empobrecido en el sacrificio indicarían una mayor respuesta al estrés. Además, la DA en el núcleo estriado está relacionada con la función motora, por lo que estos resultados estarían indicando que los animales en EE tienen una conducta más exploratoria ante una situación estresante (Melotti, Oostindjer, Bolhuis, Held, & Mendl, 2011). Así pues, estos resultados describen la activación diferencial de las vías dopaminérgica mesocorticolímbica y negroestriada en animales sometidos a estrés según sus condiciones de alojamiento.

Los niveles de NA fueron mayores en la **amígdala** y la **PFC** de animales alojados en condiciones empobrecidas. Está descrito que proyecciones noradrenérgicas del LC potencian las memorias relativas a situaciones estresantes y la respuesta al miedo y al estrés (Belujon & Grace, 2011, 2015; Ressler & Nemeroff, 2000). De hecho, niveles demasiado elevados o demasiado bajos de NA en varias regiones del SNC provocan discapacidades funcionales y de respuesta. En general, los niveles elevados de NA están relacionados con una respuesta rápida de lucha-huida, y también con regulaciones anormales ante el estrés y relacionados con estados de ansiedad (Ressler & Nemeroff, 2000). Los incrementos de NA en regiones como la amígdala pueden provocar una mayor reacción al estrés, llevando a incrementos en la liberación de CRH y GC y actividad de las vías neuronales relacionadas con la respuesta al estrés y miedo (Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005). Por otro lado, igual que se observó en el capítulo 3, el incremento de NA y DA en la PFC puede interferir en las funciones cognitivas desarrolladas por esta región (Cabib & Puglisi-Allegra, 2012).

La vía **serotoninérgica** se vio afectada en el **hipotálamo** y el **núcleo estriado** de forma inversa. Mientras que los animales criados en un entorno empobrecido mostraron niveles mayores de 5-HT en el hipotálamo, sus niveles eran menores en el núcleo estriado.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros estudios y podrían estar indicando que ante un estímulo estresante de igual intensidad, como sería en este caso el estrés en el matadero, aquellos individuos en un estado depresivo o de ansiedad que correspondería a los alojados en unas condiciones empobrecidas, tienen una reacción más potenciada a los estresores (Kloet et al., 2005).

El hecho de observar cambios más leves en la presencia de 5-HT está de acuerdo con lo concluido en otros estudios en que la vía serotoninérgica es menos sensible al estrés que la dopaminérgica y noradrenérgica (INOE).

## 2.2. Marcadores moleculares de estrés, estrés oxidativo y BDNF en SNC: EE y estrés

En los dos últimos capítulos se determinó la expresión de marcadores de estrés en el SNC, como son la proteína producto del gen temprano c-Fos, la proteína quinasa ERK1/2, el factor neurotrófico BDNF y también de estrés oxidativo por alteración oxidativa de macromoléculas. Respecto a ERK1/2, se debe tener en cuenta que, debido a las condiciones en que se obtuvieron las muestras y se prepararon los extractos, no se pudieron analizar las formas fosforiladas (activas) de la proteína, sino que lo que se determinó fue la cantidad total de proteína ERK1/2.

Las condiciones de **alojamiento** combinando un sistema intensivo con 4 horas diarias de pasto exterior no produjo ninguna diferencia en la expresión de marcadores moleculares de estrés, incluyendo BDNF, asociadas a las condiciones, pese a estar descrito que el EE produce una potenciación de los niveles de BDNF en el hipocampo, así como la activación de vías de señalización intracelulares (Brenes et al., 2008; Fox et al., 2006; Jain et al., 2012; Simpson & Kelly, 2011).

En cuanto al **estrés** por **transporte** largo y rudo por carretera, se describieron mayor expresión de **c-Fos** y de **ERK1/2** en el hipocampo de los animales sometidos a dicho transporte respecto a aquellos transportados al matadero en un trayecto corto y suave.

Está descrito que el estrés activa el factor de transcripción CREB y la expresión de c-Fos (Belujon & Grace, 2015; Chan, Brown, Ericsson, Kovács, & Sawchenko, 1993; Kovács, 1998), así como la cascada de señalización mediada por ERK, principalmente en regiones involucradas en la organización de la respuesta al estrés como son el hipocampo y la PFC (Bielas, Arck, Bruenahl, Walitza, & Grünblatt, 2014; Hoffman, Lorson, Sanabria, Olive, & Cheryl, 2015; Shen et al., 2004). Por ejemplo, los niveles de mRNA de c-Fos se vieron incrementados en lechones nacidos de cerdas sometidas a estrés en fases tardías de la gestación, indicando una mayor actividad neuronal en el hipocampo y una mayor percepción de una situación estresante (Otten et al., 2010).

En el caso del estudio, la activación de estas vías ocurre tras el transporte largo por carretera de 2 horas, de acuerdo con los cambios definidos en la expresión de c-Fos, que se dan de manera rápida, observándose los niveles máximos entre 60-90 minutos tras la aparición del estresor (Pacák & Palkovits, 2001).

También se observa una disminución en los niveles de expresión de **BDNF** asociada al **transporte** largo. Niveles bajos de BDNF están relacionados con depresión (Joca, Ferreira, & Guimarães, 2007b; Nikulina et al., 2014) o ambientes empobrecidos (Jain et al., 2012). La reducción de los niveles de BDNF en el hipocampo provoca deficiencias en neurogénesis, morfología sináptica y el procesamiento de memorias aversivas, predisponiendo a los individuos a un estado afectivo negativo (Joca et al., 2007b; Ohira & Hayashi, 2009). En este estudio, el BDNF se ve reducido al 60% en el hipocampo después de un transporte largo por carretera, sugiriendo consecuencias negativas del estrés por transporte como ya se ha descrito en otros estudios (Bennett & Lagopoulos, 2014; Duman & Monteggia, 2006).

Los cambios en los marcadores de **estrés oxidativo** producidos por cambios en las condiciones de **alojamiento**, solo se vieron representados con un incremento en los niveles de **carbonilación en proteínas** en el hipocampo de los animales con acceso a una pastura exterior de 4 horas diarias. En cuanto al efecto del **estrés** por **transporte** largo, se vio una disminución en los niveles de **carbonilación en proteínas** tanto en el **hipocampo** como en la **PFC** (tendencia). Este resultado es inesperado puesto que generalmente este parámetro se asocia a condiciones de estrés.

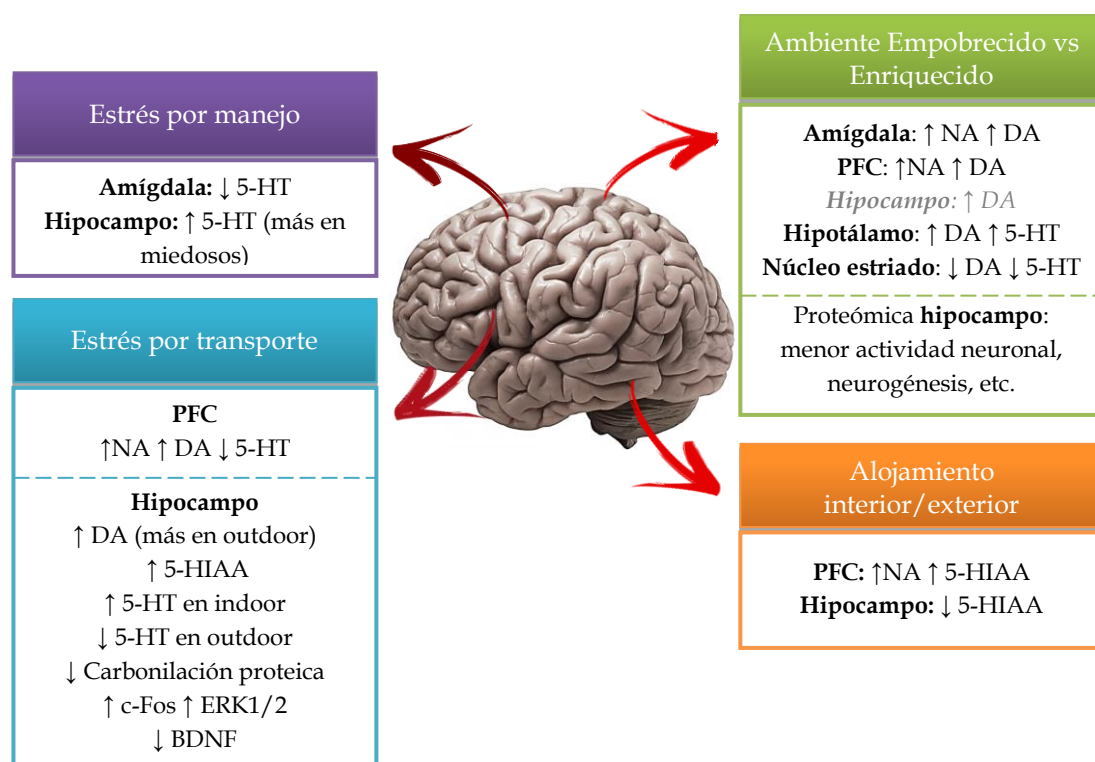
Otros estudios han descrito un incremento en los niveles de estrés oxidativo en varias regiones cerebrales tras la exposición a estrés en ratas (Ahmad et al., 2010). Se ha sugerido que estos cambios son debidos al incremento del metabolismo de las catecolaminas, ya que su oxidación produce especies reactivas del oxígeno a través de la acción de la enzima MAO. Sin embargo, nuestros resultados no han mostrado la misma respuesta. Esta diferencia puede ser debida a que la estructura de las catecolaminas tiene la capacidad de captar las especies reactivas de oxígeno ROS, por lo que se considera que la DA, la NA, y sus metabolitos, tienen capacidad antioxidante (Iuga, Alvarez-idaboy, & Vivier-bunge, 2011; Troadec et al., 2001). Por lo tanto, la disminución en los niveles de carbonilación de proteínas observada en la PFC y en el hipocampo podría estar relacionada con el incremento de catecolaminas en estas regiones.

En cualquier caso, la carbonilación de proteínas no parece ser un marcador cerebral de estrés adecuado, pues posiblemente es un parámetro afectado por otras variables aparte del estrés como sería las reacciones redox asociadas al metabolismo de catecolaminas.

En el estudio de condiciones de EE (mayor espacio y lecho con paja) no se observó ninguna diferencia significativa en ningún marcador de estrés molecular, como c-Fos o ERK1/2, ni de estrés oxidativo como la carbonilación de proteínas o la peroxidación lipídica. Otros estudios han descrito un incremento en los niveles de peroxidación lipídica en varias regiones

cerebrales tras la exposición a estrés (Ahmad et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados no han mostrado la misma respuesta. En este estudio también se analizó la correlación entre los marcadores de estrés oxidativo medidos en distintas muestras para establecer si los efectos del estrés oxidativo causado en macromoléculas en el SNC (la carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica) tienen su reflejo en moléculas medidas en el suero. No se observó ninguna correlación significativa entre estas medidas en distintas muestras, indicando que para este estudio las medidas no están relacionadas.

En la siguiente figura se muestra un esquema de los cambios observados a nivel de SNC en los 3 últimos estudios de este trabajo que son en los que se cuenta con estímulos estresantes o mejoras en las condiciones de alojamiento.



**Figura 43.** Representación gráfica de los cambios producidos en SNC por los distintos factores estudiados.

### 3. Integración del perfil del suero y del SNC

Se realizaron análisis estadísticos multivariantes en todos los capítulos con la finalidad de establecer un perfil general neurofisiológico asociado a cada condición de estrés. En este trabajo únicamente se muestran los resultados del capítulo 3 ya que fue el único caso en el que se obtuvo una discriminación destacada entre los grupos de estudio.

En primer lugar, el estudio de las correlaciones entre las variables, permitió relacionar los cambios moleculares que suceden en el estudio del capítulo 3 (alojamiento y estrés por transporte) tras las condiciones de estudio.

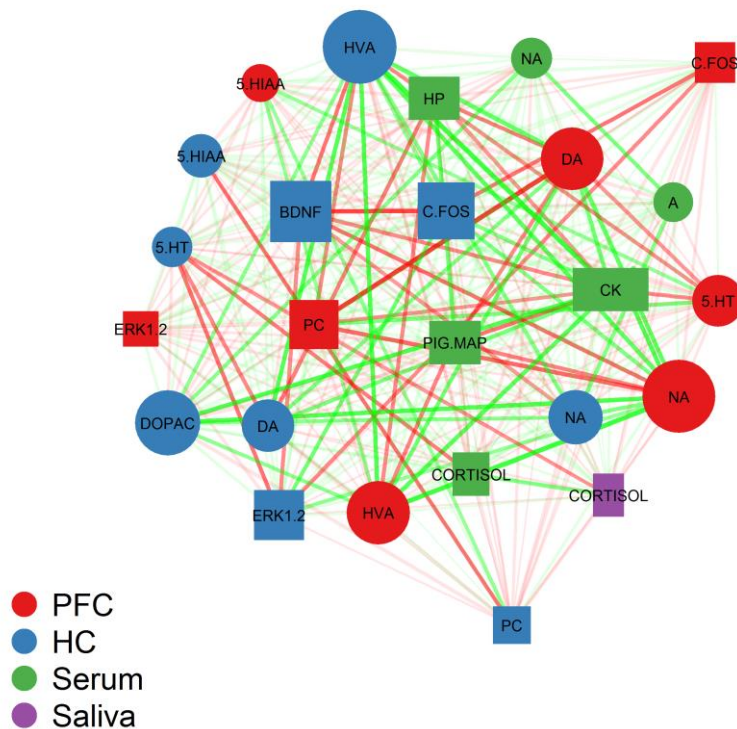
La visualización de las correlaciones entre todas las variables está presentada en la Figura 45 y la tabla correspondiente en el apéndice 1. En todos los casos los metabolitos de la misma vía biosintética están altamente correlacionados en cada región (DA, DOPAC, HVA; 5-HT, 5-HIAA), por lo tanto, y para simplificar la discusión, los términos DA y 5-HT son usados para referirse a cualquiera de los metabolitos de cada vía. Además, las vías catecolaminérgicas también están correlacionadas positivamente de manera intra e inter-regional, indicando la sinergia entre DA y NA en hipocampo, en PFC y entre estas dos regiones.

Por otro lado, c-Fos y ERK1/2 en el hipocampo están altamente correlacionadas de manera positiva, siendo indicativo de la activación de la vía de señalización intracelular mediante fosforilación que lleva a la expresión del gen temprano c-Fos, entre otros. Este a su vez está correlacionado positivamente con la DA en el hipocampo de acuerdo con lo descrito por otros investigadores (Bielas et al., 2014).

Además, esta relación entre DA y c-Fos en el hipocampo, está relacionada en sentido positivo con los niveles de NA en el PFC, y en suero. Estas fuertes correlaciones son indicativas de una activación de los mecanismos de la respuesta a estrés (Sariñana, Kitamura, Künzler, Sultzman, & Tonegawa, 2014) y a su vez, estando también unida a los niveles de CK en suero, uniendo el daño físico a las vías neuroquímicas asociadas al estrés.

Por otro lado, el factor neurotrófico BDNF, que tiene un papel importante en plasticidad sináptica, neurogénesis y actividad neuronal (Joca et al., 2007a; Lebret et al., 2015), está correlacionado negativamente con las vías de NT, los niveles de CK de suero y de c-Fos y ERK1/2 en hipocampo. El BDNF también ha sido descrito como activador de las vías de señalización mediadas por ERK y c-Fos, sin embargo los resultados multivariantes de este estudio sugieren que esta activación es mediada por la unión de las catecolaminas a sus receptores indicado por la correlación positiva descrita en el párrafo anterior (Giovannini et al., 2003; Smith & Vale, 2006).

Por otro lado, la carbonilación de proteínas está correlacionada negativamente con los niveles de NA, DA y 5-HT en el hipocampo, en sinergia con lo planteado en otros estudios en los que se relaciona el metabolismo de las catecolaminas e indolaminas con un poder antioxidante por la disminución de los radicales libres (Iuga et al., 2011; Troadec et al., 2001).



**Figura 44.** Representación gráfica de las correlaciones entre parámetros. Los nodos circulares representan parámetros de NT, los cuadrados representan marcadores moleculares y de estrés oxidativo y los rectangulares parámetros de la bioquímica del suero. El color de los nodos indica la muestra de origen (rojo: PFC; azul: hipocampo; verde: suero; lila: saliva). El tamaño de los nodos es proporcional a la suma de las correlaciones (en valor absoluto) de aquel parámetro con todo el resto. Los parámetros correlacionados positivamente están conectados por una línea verde y los correlacionados negativamente por una línea roja. Las correlaciones estadísticamente significativas ( $R > 0.4$  and  $P < 0.05$ ) están representadas por líneas gruesas y opacas, mientras que el resto ( $R < 0.4$  and  $P > 0.05$ ) están representadas por líneas transparentes.

Tras observar este número elevado de correlaciones con relevancia en la respuesta al estrés, junto con las diferencias observadas en los parámetros medidos entre los 4 grupos de estudio combinando condiciones de alojamiento interior/externo y transporte al matadero corto/largo, el análisis discriminante fue la prueba estadística elegida para seleccionar las variables más relevantes para explicar la variabilidad muestral. Del total de determinaciones realizadas tanto en suero como en SNC, el tratamiento estadístico seleccionó 4 variables: la carbonilación de proteínas en el hipocampo, la NA en el suero, los niveles del metabolismo dopaminérgico en la PFC y la 5-HT en el hipocampo.



Con el modelo basado en las variables seleccionadas se predice la condición experimental a la que pertenecen los individuos con un 83,3% de acierto. Con esta clasificación y la representación gráfica, se confirman las diferencias neurofisiológicas en el grupo de animales alojados en el exterior y sometidos a un transporte largo respecto al resto de grupos. Estos animales estarían caracterizados por bajos niveles de carbonilación en proteínas y de 5-HT en el hipocampo y por niveles elevados de NA en el suero y de DA en la PFC.

Por otro lado, con estas variables también se discriminan correctamente las dos condiciones de alojamiento pero solo en el caso de los animales transportados en un trayecto corto y suave al sacrificio. Los alojados en condiciones intensivas tendrían menor nivel de DA en la PFC y de carbonilación en proteínas y de 5-HT en el hipocampo, y mayor de NA en suero, que aquellos que tienen acceso al exterior. Estas diferencias tan claras muestran que las condiciones de alojamiento y el transporte por carretera modifica la neurofisiología de los cerdos, e sugieren el mecanismo molecular mediante el cual sucedería. La fisiología de los animales alojados parcialmente en el exterior se ve más afectada por un transporte largo que los criados en unas condiciones intensivas. Esto sugiere una capacidad diferencial de hacer frente a entornos desconocidos, posiblemente porque se les ha permitido el desarrollo de sus conductas innatas y especie específica, siendo capaces de mantener un estado de alerta ante estímulos exteriores y siendo por lo tanto, más sensibles y más activos a situaciones novedosas.

A pesar de que en este estudio no se realizó ningún test objetivo de bienestar, de comportamiento, ni de estado emocional de los animales, observaciones de los etólogos implicados en el proyecto coordinado indicaron una actitud positiva ante la pastura exterior de 4 horas al día (comunicación personal).

#### **4. Cambios proteómicos asociados al EE**

El análisis proteómico realizado en las condiciones de EE reveló 3 grandes bloques de cambios. El análisis por agrupación de categorías GO estableció 3 funciones moleculares destacables: la actividad estructural, dividida entre las proteínas ribosomales y las de citoesqueleto; la actividad catalítica y las proteínas de unión siendo mayoritariamente de unión a ácidos nucleicos.

Paralelamente, el análisis de *pathways* destacó la traducción, las vías metabólicas y las proteínas del fagosoma. La representación gráfica de las interacciones (*networks*) entre las proteínas diferenciales obtenidas, según resultados experimentales y bibliográficos), también agrupó las proteínas en 3 núcleos claramente diferenciados: las proteínas

ribosomales, las tubulinas, y las proteínas involucradas en el metabolismo energético. Es decir, hubo una coherencia total en los resultados del análisis de GO, KEGG y *networks*.

#### 4.1. Proteínas ribosomales

Del total de proteínas diferenciales, 22 son proteínas **ribosomales**, tanto de la subunidad 40S como de la 60S y se encuentran *upreguladas* en el grupo de animales criados en un entorno enriquecido respecto a los de un ambiente empobrecido. Otras dos proteínas implicadas en la traducción, las histidina y fenilalanina-tRNA **ligasas** se encuentran expresadas diferencialmente entre los dos tratamientos.

También se encuentran *upreguladas* proteínas de unión a ácidos nucleicos como la **proteína sin dominio POU de unión a octámeros** que regula la transcripción y el splicing del RNA, específicamente en la regulación de los RNA sinápticos y la organización funcional de las sinapsis GABAérgicas (Yang et al., 1993); la **proteína ELAV-like** que es una proteína de unión a RNA específica de células neuronales que se une al 3'UTR de genes entre los que destaca FOS (W. Ma, Cheng, Campbell, Wright, & Furneaux, 1996); el **activador transcripcional Pur-alpha** que se une al DNA controlando la replicación y transcripción (Bergemann, Ma, & Johnson, 1992); y la **nucleofosmina** que es una fosfoproteína implicada en varios procesos celulares como la biogénesis ribosomal y también en su unión a estos ribosomas presumiblemente para exportarlos del núcleo, y unión a cadena simple de ácidos nucleicos (Vascotto et al., 2009).

Las dendritas neuronales son la diana primaria de las aferencias sinápticas desde otras neuronas y se distinguen por su alto contenido en ribosomas y proteínas específicas del citoesqueleto que reflejan su función en la recepción y la integración de la información proveniente de otras neuronas (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004). Estudios en morfología neuronal en roedores han demostrado que el EE incrementa la densidad dendrítica en el hipocampo, el número de sinapsis y los poliribosomas en las dendritas (Jiménez et al., 2013; Kemperman, Kuhn, & Gage, 1997; Leggio et al., 2005; van Praag, Kempermann, & Gage, 2000).

En ratones se han descrito deficiencias en las proteínas ribosomales en el hipocampo asociadas a depresión. Reducciones en la biogénesis de ribosomas se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas así como con déficits del desarrollo neuronal, debido a la disminución de la proliferación, la neurogénesis y otros procesos en los que es necesaria la síntesis de proteínas. La mayor presencia de proteínas ribosomales en los animales criados en EE estaría indicando mayor neurogénesis, crecimiento y densidad dendrítica (Alvarez & Sabatini, 2007; Slomnicki et al., 2016; Smagin et al., 2016).

## 4.2. Formación de microtúbulos/Proteínas estructurales de citoplasma

Siete tipos de **tubulinas**, tanto de la cadena alfa como de la beta, así como las isoformas **miosina X** y **miosina XVIII** se encuentran *upreguladas* en el grupo sujeto a EE respecto al empobrecido.

Los microtúbulos y otros filamentos forman la estructura longitudinal de los axones y las dendritas. A parte de la función estructural, también están implicados en el transporte de proteínas implicadas en procesos axonales y dendríticos y en la formación de las vesículas de secreción. Las neuronas tienen un sistema complejo y eficiente para transportar proteínas desde el centro hasta la periferia, y viceversa. Este transporte se hace a través de las cadenas de microtúbulos y los filamentos de actina. Como se ha comentado para el caso de las proteínas ribosomales, la ramificación de las células nerviosas (la arborización dendrítica), conlleva el incremento de proteínas específicas del citoesqueleto, que reflejan su función en recepción e integración de información proveniente de otras neuronas. Estas proteínas, actina, tubulina y miosina, son fundamentales para la estabilidad y la función de las prolongaciones neuronales y las uniones sinápticas, dirigen el crecimiento de axones y dendritas, el tráfico y posicionamiento de componentes de membrana, orgánulos y vesículas, y los procesos de exocitosis y endocitosis (Kandel et al., 2013; Kapitein & Hoogenraad, 2011; Nestler et al., 2009; Purves et al., 2004).

Relacionadas con estas proteínas estructurales de citoplasmáticas y también *upreguladas* en este grupo, se encuentran la **subunidad pequeña de la calpaína**, que no posee actividad catalítica pero regula a las calpaínas 1 y 2, que son proteínas proteolíticas involucrada en proliferación, migración, adhesión, autofagia, remodelación citoesquelética y transducción de señales (J. Ma, Zhang, Wang, & Chen, 2016) ; el homólogo de la proteína **NipSnap** involucrada en la fusión y tráfico de vesículas (Kandel et al. 2013); y la proteína 10B de familia de dominio **TBC1** involucrada en el trafico vesicular (Chaineau, Ioannou, & Mcpherson, 2013). En estudios de estimulación neuronal, se ha descrito una mayor presencia de proteínas citoesqueléticas, destacando el papel de NIPSNAP1 en la transducción de señales en la sinapsis relacionada con una mayor actividad neuronal (Sato et al., 2002).

La **proteína de ribosilación-ADP factor-like 2**, que es una proteína G monomérica reguladora de la formación de nuevos microtúbulos se encuentra *downregulado* en los animales del grupo EE. Se ha descrito que este factor se une a la GTP-tubulina previniendo su degradación y por lo tanto modulando la dinámica de la formación de microtúbulos (Bhamidipati, Lewis, & Cowan, 2000).

### 4.3. Proteínas del metabolismo energético

En este grupo se encuentran varios tipos de proteínas. Por un lado las proteínas mitocondriales involucradas en la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa; dos subunidades de la **NADH:ubiquinona oxidorreductasa** o **complejo I** y la **succinato deshidrogenasa**, que están *upreguladas* en EE. Relacionada con estas proteínas mitocondriales, también destaca la presencia de **TOM70**, una proteína involucrada en la importación de proteínas precursoras mitocondriales.

Por otro lado, determinadas proteínas del metabolismo energético se encuentran *downreguladas* en EE. Son la **transcetolasa** que conecta la vía de las pentosas fosfato con la glicólisis, derivando el exceso de azúcares fosforilados a la glicólisis, la **ADP-ribosa pirofosfatasa** que actúa hidrolizando ADP-ribosas; la **lisofosfolipasa** que cataliza la hidrólisis de un enlace éster de ácidos grasos; la **acetil-CoA acetiltransferasa** una tiolasa que cataliza la unión de 2 Acetil-CoA; el **factor regulador de adipogénesis** y la **maleilacetoacetato isomerasa** involucrada en la degradación de tirosina.

Esto indica que los animales alojados en un ambiente enriquecido tienen más capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa, y por lo tanto la síntesis de ATP, y sugiere que pueden tener disminuidas las vías catabólicas de degradación de glúcidos y aminoácidos. La síntesis de proteínas en los ribosomas requiere una gran cantidad de energía de forma de ATP, por lo que es congruente identificar un aumento de componentes de la cadena respiratoria mitocondria.

Las células del SNC contienen gran número de mitocondrias debido a su elevada actividad metabólica. Es por ello que la desregularización de las vías de producción de energía, como la glicólisis, el ciclo de Krebs o la fosforilación oxidativa está relacionada con trastornos psiquiátricos, como depresión, trastorno bipolar o esquizofrenia (Martins-de-Souza, Harris, & Guest, 2011).

Además, estudios en trastornos depresivos y esquizofrenia muestran actividades mayores en la glicólisis pero reducidas de los complejos de la fosforilación oxidativa en modelos de estrés crónico (Detka et al., 2015; Kanarik et al., 2011; Tagliari, Noschang, Ferreira, & Ferrari, 2010).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la función de la fosforilación oxidativa es la formación de ATP, el potenciamiento de las vías de degradación de glúcidos, lípidos y aminoácidos podría estar potenciado para compensar la debilidad de la fosforilación oxidativa en los animales en un entorno empobrecido, como se sugiere en estudios de trastornos psiquiátricos (Detka et al., 2015; Martins-de-Souza et al., 2011).

Finalmente, se han identificado dos proteínas implicadas en la biosíntesis de monoaminas, la **dihidropteridina reductasa**, *downregulada* en EE, cuyo producto de reacción es un cofactor de la tirosina y triptófano hidroxilasas, enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas e indolaminas; y la **monoamina oxidasa A**, *upregulada* en EE, implicada en la degradación de estos NT. Este hecho concuerda con la tendencia a niveles menores de DA observada en el hipocampo de los animales alojados en un entorno empobrecido.

La expresión diferencial de estas proteínas relacionadas con neurogénesis y actividad neuronal en condiciones de EE, conjuntamente con los niveles de NT sugiriendo una menor respuesta al estrés sugiere un mayor bienestar en los cerdos alojados en EE. Además, en este estudio se realizaron medidas de comportamiento dentro del proyecto coordinado. En estos estudios se observó que los cerdos alojados en condiciones enriquecidas tenían medidas de comportamiento indicativas de mayor bienestar que los criados en un entorno empobrecido, así como un menor número de lesiones en la canal, sugiriendo que las condiciones de alojamiento enriquecidas tienen un efecto positivo en el estado emocional de los cerdos (Carreras, Mainau, et al., 2016).

# CONCLUSIONES



### **Capítulo 1: Sexo y susceptibilidad al estrés por el gen halotano**

- El estrés producido por el sacrificio provoca el incremento de proteína C-reactiva, cortisol, glucosa y triglicéridos en suero.
- Los cerdos con genotipo Nn tienen mayores niveles de proteína C-reactiva y de actividad de la creatina quinasa en suero. No se observan variaciones en los niveles de neurotransmisores cerebrales, sugiriendo que el genotipo Nn no confiere mayor susceptibilidad al estrés que el NN.
- Las hembras tienen incrementado el metabolismo energético y niveles más altos de las proteínas de fase aguda haptoglobina y proteína C-reactiva. También muestran mayor respuesta al estrés por el sacrificio reflejado en el incremento de marcadores del metabolismo energético en el sacrificio.
- El perfil de neurotransmisores confiere un patrón específico para cada área cerebral que se mantiene en los capítulos siguientes.

### **Capítulo 2: estrés por manejo y fenotipo miedoso**

- El estrés por manejo en el matadero no produce cambios en los marcadores bioquímicos del suero.
- En las regiones estudiadas del SNC, este estrés únicamente causa una leve alteración de la vía serotoninérgica en la amígdala y el hipocampo.
- Los animales considerados miedosos tienen una reacción más adversa ante este factor estresante, valorado por mayores proyecciones serotoninérgicas aferentes en el hipocampo.

### **Capítulo 3: estrés por transporte y condiciones de alojamiento interior/exterior**

- El estrés por transporte largo y rudo al matadero produce un incremento en la actividad de la creatina quinasa en suero.
- El acceso al exterior durante 4 horas al día provoca una disminución de la haptoglobina en el suero.
- El estrés por transporte provoca cambios en el SNC:
  - Activación de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica, indicado por mayor presencia de dopamina en la corteza prefrontal y en el hipocampo.
  - Activación las proyecciones noradrenérgicas hacia la corteza prefrontal.
  - Disminución de la carbonilación en proteínas posiblemente facilitada por la capacidad antioxidante de estos neurotransmisores y sus metabolitos.



- Incremento en la expresión de los marcadores moleculares de estrés c-Fos y ERK1/2.
- Disminución del factor neurotrófico BDNF.
- Los cambios diferenciales en los niveles de algunos parámetros, como la dopamina en el hipocampo y la noradrenalina en suero en el grupo de animales en condiciones de exterior sometidos a un transporte largo, así como la discriminación perfecta obtenida en este grupo en el análisis multivariante sugiere una respuesta al estrés diferencial.

#### **Capítulo 4: enriquecimiento ambiental**

- El alojamiento en un ambiente enriquecido produce una reducción en los niveles de lactato y cortisol en suero.
- El estrés por sacrificio conlleva a mayores niveles de actividad de la creatina quinasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa, así como mayor concentración de lactato en suero.
- El enriquecimiento ambiental durante el engorde no propicia diferencias en los marcadores de estrés en suero tras el sacrificio.
- Existen numerosas diferencias en las vías de neurotransmisores monoaminérgicos en varias áreas del SNC asociadas al enriquecimiento ambiental:
  - La vía dopaminérgica mesocorticolímbica se ve activada, en relación con la respuesta a estrés y emociones, y la negroestriada, relacionada con la motivación y la recompensa se ve disminuida en un entorno empobrecido.
  - La vía noradrenérgica activa las proyecciones a la amígdala y a la corteza prefrontal.
  - La vía serotoninérgica incrementa los niveles de serotonina en el hipotálamo y disminuye en el núcleo estriado.
- Las condiciones de alojamiento no producen cambios en el factor neurotrófico BDNF ni en marcadores moleculares de estrés, ni estrés oxidativo en el SNC.
- El estudio proteómico mediante iTRAQ en el hipocampo distingue 3 grupos funcionales de proteínas expresadas diferencialmente, que indican una mayor actividad neuronal, neurogénesis y arborización dendrítica en unas condiciones de alojamiento enriquecido:
  - Mayor abundancia de proteínas ribosomales.
  - Mayor presencia de proteínas estructurales del citoesqueleto.
  - Mayor abundancia de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y menor de determinadas enzimas metabólicas metabolismo energético.

# REFERENCIAS



## REFERENCIAS

- Adeola, O., Ball, R. O., House, J. D., & O'Brien, P. J. (1993). Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs. *Journal of animal science*, 71(4), 968-74.
- Ahmad, A., Rasheed, N., Banu, N., & Palit, G. (2010). Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress*, 3890, 356-365.
- Albert, P. R., Vahid-ansari, F., & Luckhart, C. (2014). Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 1-13.
- Alvarez, V. A., & Sabatini, B. L. (2007). Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 79-98.
- Andrews, M. H., & Matthews, S. G. (2004). Programming of the Hypothalamo - Pituitary - Adrenal Axis: Serotonergic Involvement. *Stress*, 7(1), 15-27.
- Antoniadis, E. A., & McDonald, R. J. (2000). Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behavioural Brain Research*, 108, 1-19.
- Arco, A. Del, Segovia, G., Garrido, P., Blas, M. De, & Mora, F. (2007). Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behavioural Brain Research*, 176, 267-273.
- Arnsten, A. F. T. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 410-422.
- Asan, E., Steinke, M., & Lesch, K.-P. (2013). Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochemistry and cell biology*,
- Bard, P. (1934). On emotional expression after decortication with some remarks on certain theoretical views. *The Psychological Review*, 41(4), 309-329.
- Bates, R. O., Doumit, M. E., Raney, N. E., Helman, E. E., & Ernst, C. W. (2012). Association of halothane sensitivity with growth and meat quality in pigs. *Animal*, 6(9), 1537-42.
- Batzina, A., Dalla, C., Tsopelakos, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Karakatsouli, N. (2014). Environmental enrichment induces changes in brain monoamine levels in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Physiology & behavior*, 130C, 85-90.
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2011). Hippocampus, amygdala and stress: Interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 114-121.
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2015). Regulation of dopamine system responsivity and its adaptive and pathological response to stress. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 1-10.
- Bennett, M. R., & Lagopoulos, J. (2014). Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Progress in Neurobiology*, 112, 80-99.
- Bergemann, A. D., Ma, Z. W., & Johnson, E. M. (1992). Sequence of cDNA comprising the human pur gene and sequence-specific single-stranded-DNA-binding properties of the encoded protein. *Mol. Cell. Biol.*, 12(12), 5673-5682.
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus - noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research*

- Reviews*, 42, 33-84.
- Bhamidipati, A., Lewis, S. A., & Cowan, N. J. (2000). ADP Ribosylation Factor-like Protein 2 (Arl2) Regulates the Interaction of Tubulin-folding Cofactor D with Native Tubulin. *The Journal of Cell*, 149(5), 1087-1096.
- Bielas, H., Arck, P., Bruenahl, C. A., Walitza, S., & Grünblatt, E. (2014). Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38,
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain : an update. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 194-202.
- Black, P. H. (2002). Stress and the inflammatory response : A review of neurogenic inflammation. *Brain Behavior and Immunity*, 16(6), 622-653.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors , fear , and anxiety. En *Handbook of Anxiety and Fear* (Vol. 17, pp. 63-79).
- Bland, S. T., Hargrave, D., Pepin, J. L., Amat, J., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2003). Stressor Controllability Modulates Stress-Induced Dopamine and Serotonin Efflux and Morphine-Induced Serotonin Efflux in the Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1589-1596.
- Blum, K., Chen, A. L., Giordano, J., Borsten, J., Chen, T. J., Hauser, M., ... Barh, D. (2012). The Addictive Brain: All Roads Lead to Dopamine. *Journal of Psychoactive Drugs*, 44(2), 134-143.
- Bondar, N. P., & Merkulova, T. I. (2016). Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay. *Journal of Bioscience*, 41(4), 751-758.
- Brenes, J. C., Rodríguez, O., & Fornaguera, J. (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89, 85-93.
- Broom, D. M. (1986). INDICATORS OF POOR WELFARE. *Br. vet. J.*, 142, 524-526.
- Broom, D. M. (1991). Animal Welfare: Concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69, 4167-4175.
- Cabib, S., & Puglisi-Allegra, S. (2012). The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(1), 79-89.
- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, IX(3), 399-431.
- Caroldi, S., Jarvis, J., & Magos, L. (1985). Carbon disulphide exposure affects the response of rat adrenal medulla to hypothermia and hypoglycaemia. *Br. J. Pharmac*, 84, 357-363.
- Carrasco, G. A., & Van de Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 463, 235-272.
- Carreras, R., Arroyo, L., Mainau, E., Peña, R., Bassols, A., Dalmau, A., ... Velarde, A. (2016). Effect of gender and halothane genotype on cognitive bias and its relationship with fear in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 177, 12-18.
- Carreras, R., Mainau, E., Arroyo, L., Moles, X., González, J., Bassols, A., Velarde, A. (2016). Housing conditions do not alter cognitive bias but affect serum cortisol, qualitative behaviour assessment and wounds on the carcass in pigs. *Applied Animal Behaviour*

- Science*, 185, 39-44.
- Carreras, R., Mainau, E., Rodriguez, P., Llonch, P., Dalmau, A., Manteca, X., & Velarde, A. (2015). Cognitive bias in pigs: Individual classification and consistency over time. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 10(6), 577-581.
- Chaineau, M., Ioannou, M. S., & Mcpherson, P. S. (2013). Rab35: GEFs, GAPs and Effectors. *Traffic*, 14(11), 1109-1117.
- Chan, R. K., Brown, E. R., Ericsson, A., Kovács, K. J., & Sawchenko, P. E. (1993). A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(12), 5126-38.
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 299-309.
- Chick, J. M., Munger, S. C., Simecek, P., Huttlin, E. L., Choi, K., Gatti, D. M., ... Gygi, S. P. (2016). Defining the consequences of genetic variation on a proteome-wide scale. *Nature*, 534, 500-505.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 374-81.
- Council, F. A. W. (1992). Updates of the five freedoms. *Vet. Rec.*, 131, 357.
- Crofton, E., Zhang, Y., & Green, T. (2016). Inoculation Stress Hypothesis of Environmental Enrichment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19-31.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., Fleur, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., ... Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of " comfort food ". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11696-11701.
- De Oliveira, L., Hoffmann, A., & Menescal-de-Oliveira, L. (1997). Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiology & behavior*, 62(5), 1171-8. Recuperado a partir de
- de Sevilla, X. F., Casellas, J., Tibau, J., & Fàbrega, E. (2009). Consistency and influence on performance of behavioural differences in Large White and Landrace purebred pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 117(1-2), 13-19.
- Delaville, C., De Deurwaerdère, P., & Benazzouz, A. (2011). Noradrenaline and Parkinson's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 1-12.
- Detka, J., Kurek, A., Kucharczyk, M., Kubera, M., Lason, W., & Budziszewska, B. (2015). BRAIN GLUCOSE METABOLISM IN AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION. *Neuroscience*, 295, 198-208.
- Diamond, D. M., Bennett, M. C., Fleshner, M., & Rose, G. M. (1992). Inverted-U Relationship Between the Level of Peripheral Corticosterone and the Magnitude of Hippocampal Primed Burst Potentiation. *Hippocampus*, 2(4), 421-430.
- Dinan, T. G. (1996). Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life sciences*, 58(20), 1683-94.
- Douglas, A. J. (2005). Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the Hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress*, 8(1), 5-18.
- Duman, R. S. (2004). Role of Neurotrophic Factors in the Etiology and Treatment of Mood

- Disorders. *NeuroMolecular Medicine*, 5, 11-25.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116-1127.
- Dunn, J. D., & Whitener, J. (1986). Plasma Corticosterone Responses to Electrical Stimulation of the Amygdaloid Complex: Cytoarchitectural Specificity. *Neuroendocrinology*, 42, 211-217.
- Edwards, S. A. (2005). Product quality attributes associated with outdoor pig production. *Livestock Production Science*, 94, 5-14.
- Einarsson, S., Brandt, Y., Lundeheim, N., & Madej, A. (2008). Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(48).
- Erhard, H. W., & Mendl, M. (1999). Tonic immobility and emergence time in pigs - More evidence for behavioural strategies. *Applied Animal Behaviour Science*, 61(3), 227-237.
- Fernández-Teruel, A., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., & Tobeá, A. (2002). Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 233-245.
- Fernandez, M. V. S., Johnson, J. S., Abuajamieh, M., Stoakes, S. K., Seibert, J. T., Cox, L., ... Baumgard, L. H. (2015). Effects of heat stress on carbohydrate and lipid metabolism in growing pigs. *Physiological Reports*, 3(2), 1-17.
- Flugge, G. (2000). Regulation of Monoamine Receptors in the Brain: Dynamic Changes during Stress. *International Review of Cytology*, 195, 145-213.
- Fox, C., Merali, Z., & Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, 175, 1-8.
- Fraser, D., Duncan, I. J. H., Edwards, S. A., Grandin, T., Gregory, N. G., Guyonnet, V., ... Whay, H. R. (2013). General Principles for the welfare of animals in production systems: The underlying science and its application. *The Veterinary Journal*, 198, 19-27.
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., ... Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144-1170.
- Galani, R., Berthel, M.-C., Lazarus, C., Majchrzak, M., Barbelivien, A., Kelche, C., & Cassel, J.-C. (2007). The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(1), 1-10.
- Garrido, P., De Blas, M., Ronzoni, G., Cordero, I., Antón, M., Giné, E., ... Mora, F. (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission*, 120(5), 829-843.
- Giovannini, M. G., Efoudebe, M., Passani, M. B., Baldi, E., Bucherelli, C., Giachi, F., ... Blandina, P. (2003). Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(27), 9016-9023.
- Gispert, M., Faucitano, L., Coll, C., Siggens, K., Harvey, K., & Diestre, A. (2000). A survey of

- pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science*, 55, 97-106.
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), 109-120.
- Grandin, T. (1997). Assessment of Stress During Handling and Transport. *Journal of Animal Science*, 75, 249-257.
- Hair, J., Black, W., Babin, B., Anderson, R., & Tatham, R. (2006). *Multivariate Data Analysis*. New Jersey: Pearson University Press.
- Hajós-Korcsok, E., Robinson, D. D., Yu, J. H., Fitch, C. S., Walker, E., & Merchant, K. M. (2003). Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74, 609-616.
- Han, J., Bizon, J. L., Chun, H., Maus, C. E., & Gallagher, M. (2002). Decreased glucocorticoid receptor mRNA and dysfunction of HPA axis in rats after removal of the cholinergic innervation to hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 16, 1399-1404.
- Hashimoto, S., Inoue, T., & Koyama, T. (1999). Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *European journal of pharmacology*, 378(1), 23-30.
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo - pituitary - adrenocortical axis. *Trends in Neurosciences*, 20, 78-84.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo - pituitary - adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24, 151-180.
- Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., ... Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*, 6(2), 603-621.
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29, 1201-1213.
- Hoffman, A. N., Lorson, N. G., Sanabria, F., Olive, M. F., & Cheryl, D. (2015). Chronic stress disrupts fear extinction and enhances amygdala and hippocampal Fos expression in an animal model of post- traumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 139-147.
- Honeyman, M. S. (2005). Extensive bedded indoor and outdoor pig production systems in USA : current trends and effects on animal care and product quality. *Lives*, 94, 15-24.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609-642.
- Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. (1991). Efferent Projections of the Infralimbic Cortex of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 308, 249-276.
- Iuga, C., Alvarez-idaboy, J. R., & Vivier-bunge, A. (2011). ROS Initiated Oxidation of Dopamine under Oxidative Stress Conditions in Aqueous and Lipidic Environments. *The Journal of Physical Chemistry*, 115, 12234-12246.
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine Receptors and



- Brain Function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503-1519.
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Endocrine Reviews*, 12(2), 118-134.
- Jain, V., Baitharu, I., Barhwal, K., Prasad, D., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2012). Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced neurodegeneration and is independent of antioxidant signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(4), 599-611.
- Jansen, A. S. P., Nguyen, X. Van, Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C., & Loewy, A. D. (1995). Central Command Neurons of the Sympathetic Nervous System: Basis of the Fight-or-Flight Response. *Science*, 270, 644-646.
- Jiménez, J., Ferrary, B., Maidana, P., Diaz, R., Hermel, E., Achaval, M., ... Orlandi, L. (2013). Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia - ischemia in the rat. *Experimental Neurology*, 241, 25-33.
- Joca, S. R. L., Ferreira, F. R., & Guimarães, F. S. (2007a). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress*, 10(3), 227-249.
- Joca, S. R. L., Ferreira, F. R., & Guimarães, F. S. (2007b). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 10(3), 227-249.
- Jong, I. C. De, Prella, I. T., Burgwal, J. A. Van De, Lambooi, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J., & Koolhaas, J. M. (2000). Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology and Behavior*, 68, 571-578.
- Kanarik, M., Alttoa, A., Matrov, D., Kõiv, K., Sharp, T., Panksepp, J., & Harro, J. (2011). Brain responses to chronic social defeat stress: Effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology*, 21(1), 92-107.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science*. (A. Sydor & H. Lebowitz, Eds.) (5th editio). McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2011). Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 9-20.
- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal Chem*, 60, 2299-2301.
- Kemperman, G., Kuhn, H., & Gage, F. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-495.
- Kirby, L. G., Allen, A. R., & Lucki, I. (1995). Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain research*, 682(1-2), 189-96. Recuperado a partir de
- Kloet, E. R. De, Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 463-475. <http://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Klont, R. E., Hulsegge, B., Gerritzen, M. A., Kurt, E., Jong, I. C. De, & Kranen, R. W. (1999). Relationships between behavioral and meat quality characteristics of pigs raised under

- barren and enriched housing conditions. *Journal of Animal Science*, 79, 2835-2843.
- Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry international*, 33(4), 287-97.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev*, 89, 535-606.
- Lanfumeey, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C., & Hamon, M. (2008). Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1174-1184.
- Lang, P. J., Davis, M., & Ohman, A. (2000). Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders*, 61, 137-159.
- Lebret, B., Ecolan, P., Bonhomme, N., Méteau, K., & Prunier, A. (2015). Influence of production system in local and conventional pig breeds on stress indicators at slaughter, muscle and meat traits and pork eating quality. *Animal*, 9(8), 1404-1413.
- Ledoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.
- Leggio, M., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., & Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163, 78-90.
- Leite-Panissi, C. R. A., Ferrarese, A. A., Terzian, A. L. B., & Menescal-de-Oliveira, L. (2006). Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Research Bulletin*, 69(4), 356-64.
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173, 502-511.
- Ma, J., Zhang, K., Wang, Z., & Chen, G. (2016). Progress of research on diffuse axonal injury after traumatic brain injury. *Neural Plasticity*, 2016.
- Ma, W., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., & Furneaux, H. (1996). Nucleic Acids, Protein Synthesis, and Molecular Genetics: Cloning and Characterization of HuR, a Ubiquitously Expressed Elav-like Protein Cloning and Characterization of HuR, a Ubiquitously Expressed Elav-like Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8144-8151.
- MacLean, P. (1949). Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosomatic medicine*, 11(6), 338-353.
- Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 829-841.
- Mansour, A., & Watson, S. J. (1988). Dopamine Receptor Expression in the Central Nervous System. *American College of Neuropsychopharmacology*.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Peña, R., Pato, R., Saco, Y., Fraile, L., Bassols, A. (2016). Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers. *BMC Veterinary Research*, 12, 265.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Saco, Y., García-Heredia, A., Camps, J., Fina, M., Bassols, A. (2012). Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptive physiological mechanism in cows under different production systems. *Journal of*

- Proteomics*, 75(14), 4399-4411.
- Marco-Ramell, A., Pato, R., Peña, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J. L., & Bassols, A. (2011). Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *The Veterinary Journal*, 190(2), e66-71.
- Maren, S., & Holmes, A. (2016). Stress and Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 41, 58-79.
- Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., ... Cerón, J. J. (2016). Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Veterinary Research*, 12, 1-9.
- Martinowich, K., & Lu, B. (2008). Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 33, 73-83.
- Martins-de-Souza, D., Harris, L. W., & Guest, P. C. (2011). The Role of Energy Metabolism Dysfunction and Oxidative Stress in Schizophrenia Revealed by Proteomics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 2067-2079.
- Matsuo, M., Kataoka, Y., Mataka, S., Kato, Y., & Oi, K. (1996). Conflict situation increases serotonin release in rat dorsal hippocampus: in vivo study with microdialysis and Vogel test. *Neuroscience letters*, 215, 197-200.
- McQuaid, R. J., Audet, M.-C., Jacobson-Pick, S., & Anisman, H. (2012). The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16, 1-13.
- Melotti, L., Oostindjer, M., Bolhuis, J. E., Held, S., & Mendl, M. (2011). Coping personality type and environmental enrichment affect aggression at weaning in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 133(3-4), 144-153.
- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70, 83-244.
- Millet, S., Moons, C. P. H., Oeckel, M. J. Van, & Janssens, G. P. J. (2005). Welfare, performance and meat quality of fattening pigs in alternative housing and management systems: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 709-719.
- Millet, S., Moons, C. P., Van Oeckel, M. J., & Janssens, G. P. (2005). Welfare, performance and meat quality of fattening pigs in alternative housing and management systems: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 709-719.
- Moore, R. E., Kirwan, J., Doherty, M. K., & Whitfield, P. D. (2007). Biomarker Discovery in Animal Health and Disease: The Application of Post-Genomic Technologies. *Biomarker Insights*, 2, 185-196.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S., & Petre, C. O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29, 1214-1224.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., ... Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic - pituitary - adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 92, 317-339.
- Munckt, A., Guyre, P. M., & Holbrooke, N. J. (1984). Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions. *Endocrine Reviews*, 5(1), 25-44.

- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168(1), 28-40.
- Nestler, E. J., Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2009). *Molecular Neuropharmacology* (Second Edi). The McGraw-Hill Companies.
- Ngapo, T. M., Dransfield, E., Martin, J., Magnusson, M., Bredahl, L., & Nute, G. R. (2003). Consumer perceptions: pork and pig production. Insights from France, England, Sweden and Denmark. *Meat Science*, 66, 125-134.
- Nikulina, E. M., Johnston, C. E., Wang, J., & Jr, R. P. H. (2014). Review Neurotrophins in the Ventral Tegmental Area : Role in Social Stress , Mood Disorders and Drug Abuse. *Neuroscience*, 282, 122-138.
- Ohira, K., & Hayashi, M. (2009). A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Current neuropharmacology*, 7(4), 276-285.
- OIE, O. for A. H. (2012). Introduction to the recomendations for animal welfare. Paris, France: 21st Ed. World.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: a never-ending story. *European journal of pharmacology*, 753, 2-18.
- Otten, W., Kanitz, E., Couret, D., Veissier, I., Prunier, a, & Merlot, E. (2010). Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domestic animal endocrinology*, 38(3), 146-56.
- Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*, 22(4), 502-548.
- Pani, L., Porcella, A., & Gessa, G. L. (2000). The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Molecular Psychiatry*, 5, 14-21.
- Papez, J. W. (1937). A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology & Psychiatry*, 38(4), 725-743.
- Pavlov, I. . (1927). *Conditioned Reflexes*. New York: Dover.
- Pessoa, L. (2017). A Network Model of the Emotional Brain. *Trends in Cognitive Sciences*, 21(5), 357-371.
- Petersen, H. H. P., Nielsen, J. P. N., & Heegaardb, P. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.
- Pezze, M. A., & Feldon, J. (2004). Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in neurobiology*, 74(5), 301-20. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.004>
- Piekarzewska, A., Rosochacki, S. J., & Sender, G. (2000). The effect of acute restraint stress on regional brain neurotransmitter levels in stress-susceptible pietrain pigs. *Journal of veterinary medicine*, 47(5), 257-269.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Andres, M., Lorenzo, E., Pozo, M., ... Lampreave, F. (2009). Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *The Veterinary Journal*, 179, 78-84.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., ... Lampreave, F. (2007). Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 173(3), 669-74.
- Potes, Y., Oliván, M., Rubio-González, A., de Luxán-Delgado, B., Díaz, F., Sierra, V., ... Coto-Montes, A. (2017). Pig cognitive bias affects the conversion of muscle into meat by

- antioxidant and autophagy mechanisms. *Animal*, 1-9.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S., Mcnamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neurociencia* (3ª Edición). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Rainville, J., Pollard, K., & Vasudevan, N. (2015). Membrane-initiated non-genomic signaling by estrogens in the hypothalamus: cross-talk with glucocorticoids with implications for behavior. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 1-18.
- Ressler, K. J., & Nemeroff, C. B. (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, 12(1), 2-19.
- Robinson, C. E., Keshavarzian, A., Pasco, D. S., Frommel, T. O., Winship, D. H., & Holmes, E. W. (1999). Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Analytical Biochemistry*, 266(1), 48-57.
- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of Stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20, 89-95.
- Rosen, J. B., & Schulkin, J. (1998). From Normal Fear to Pathological Anxiety. *Psychological Review*, 105(2), 325-350.
- Rosenzweig, M. R., & Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78, 57-65.
- Ross, P. L., Huang, Y., Marchese, J., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., ... Pappin, D. (2004). Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(12), 1154-1169.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., ... Moruzzi, G. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 24, 1850-1856.
- Rueter, L. E., & Jacobs, B. L. (1996). A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Research*, 739, 57-69.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589-601.
- Rutledge, R. B., Skandali, N., Dayan, P., & Dolan, R. J. (2015). Dopaminergic Modulation of Decision Making and Subjective Well-Being. *Journal of Neuroscience*, 35(27), 9811-9822.
- Sabria, J., Torres, D., Pasto, M., Peralba, J. M., Allali-Hassani, A., & Pares, X. (2003). Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex and hippocampus. *Addiction Biology*, 8(3), 287-294.
- Saco, Y., Docampo, M. J., Fabrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., & Bassols, A. (2003). Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare*, 12, 403-409.
- Saco, Y., Fina, M., & Bassols, A. (2008). Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *The Veterinary Journal*, 177, 439-441.

- Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., & Doglione, L. (2008). Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Veterinary Journal*, 177(1), 110-115.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 6174-6177.
- Sariñana, J., Kitamura, T., Künzler, P., Sultzman, L., & Tonegawa, S. (2014). Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R , in hippocampal dependent memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1-6.
- Satoh, K., Takeuchi, M., Oda, Y., Deguchi-tawarada, M., Sakamoto, Y., Matsubara, K., ... Takai, Y. (2002). Identification of activity-regulated proteins in the postsynaptic density fraction. *Gene to Cells*, 7, 187-197.
- Schott, B. H., & Duzel, E. (2008). The multiple roles of dopaminergic neurotransmission in episodic memory. En *Handbook of Episodic Memory* (Vol. 18, pp. 379-396).
- Schrijver, N. C. A., Bahr, N. I., Weiss, I. C., & Würbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73, 209-224.
- Schubert, K. O., Föcking, M., Wynne, K., & Cotter, D. R. (2015). Proteome and pathway effects of chronic haloperidol treatment in mouse hippocampus. *Proteom*, 10-26.
- Seamans, J. K., & Yang, C. R. (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74, 1-57.
- Segovia, G., Arco, A. Del, Blas, M. De, Garrido, P., & Mora, F. (2008). Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behavioural Brain Research*, 187, 304-311.
- Segovia, G., Arco, A. Del, & Mora, F. (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *Journal of Neural Transmission*, 116(8), 1007-1016.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138, 32.
- Selye, H. (1950). STRESS AND THE GENERAL ADAPTATION SYNDROME. *British Medical Journal*, 1383-1392.
- Selye, H. (1998). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Neuropsychiatry classics*, 10(2), 230-231.
- Sethi, S., Chourasia, D., & Parhar, I. S. (2015). Approaches for targeted proteomics and its potential applications in neuroscience. *Journal of Biosciences*, 40(3), 607-627.
- Shen, C., Tsimberg, Y., Salvadore, C., & Meller, E. (2004). Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC neuroscience*, 5, 36.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J., & Boonstra, R. (2010). Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story? *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), 614-619.
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research*, 222(1), 246-264.
- Slomnicki, L. P., Pietrzak, M., Vashishta, A., Jones, J., Lynch, N., Elliot, S., ... Hetman, M.

- (2016). Requirement of Neuronal Ribosome Synthesis for Growth and Maintenance of the Dendritic Tree. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 5721-5739.
- Smagin, D. A., Kovalenko, I. L., Galyamina, A. G., Bragin, A. O., Orlov, Y. L., & Kudryavtseva, N. N. (2016). Dysfunction in Ribosomal Gene Expression in the Hypothalamus and Hippocampus following Chronic Social Defeat Stress in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. *Neural Plasticity*, 2016, 1-6.
- Smeets, W. J. A. J., & Gonzalez, A. (2000). Catecholamine systems in the brain of vertebrates : new perspectives through a comparative approach. *Brain Research Reviews*, 33, 308-379.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383-395.
- Stanford, S. C. (1995). Central noradrenergic neurones and stress. *Pharmacology and Therapeutics*, 68(2), 297-342.
- Tagliari, B., Noschang, C. G., Ferreira, A. G. K., & Ferrari, O. A. (2010). Chronic variable stress impairs energy metabolism in prefrontal cortex and hippocampus of rats: prevention by chronic antioxidant treatment. *Metabolism Brain Disease*, 25, 169-176.
- Tanaka, M., Yoshida, M., Emoto, H., & Ishii, H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology*, 405, 397-406.
- Terlouw, C., Berne, A., & Astruc, T. (2009). Effect of rearing and slaughter conditions on behaviour , physiology and meat quality of Large White and Duroc-sired pigs. *Livestock Science*, 122(2-3), 199-213.
- Terlouw, E. M. C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Bihan-duval, E. Le, Deiss, V., ... Lefe, F. (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal*, 2(10), 1501-1517.
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317-331.
- Tozawa, A., Tanaka, S., & Sato, S. (2016). The Effects of Components of Grazing System on Welfare of Fattening Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 29(3), 428-435.
- Troadec, J.-D., Darios, Â., Hartmann, A., Ruberg, M., Marien, M., Colpaert, F., & Michel, P. P. (2001). Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 79, 200-210.
- Ursinus, W. W., Bolhuis, J. E., Zonderland, J. J., Rodenburg, T. B., Souza, A. S. De, Koopmanschap, R. E., ... Reenen, C. G. Van. (2013). Relations between peripheral and brain serotonin measures and behavioural responses in a novelty test in pigs. *Physiology & Behavior*, 118, 88-96.
- Vahabzadeh, A., & Fillenz, M. (1994). Comparison of Stress-induced Changes in Noradrenergic and Serotonergic Neurons in the Rat Hippocampus Using Microdialysis. *European Journal of Neuroscience*, 6, 1205-1212.
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 125-132.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), 191-198.
- Vascotto, C., Fantini, D., Romanello, M., Cesaratto, L., Deganuto, M., Leonardi, A., ... Tell, G.

- (2009). APE1/Ref-1 Interacts with NPM1 within Nucleoli and Plays a Role in the rRNA Quality Control Process. *Molecular and Cellular Biology*, 29(7), 1834-1854.
- Verdon, M., Hansen, C. F., Rault, J., Jongman, E., Hansen, L. U., Plush, K., & Hemsworth, P. H. (2015). Effects of group housing on sow welfare: A review. *Journal of Animal Science*, 93, 1999-2017.
- Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2002). Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depression and Anxiety*, 15(3), 126-147.
- Wang, S., Ni, Y., Guo, F., Sun, Z., Ahmed, A., & Zhao, R. (2014). Differential expression of hypothalamic fear- and stress-related genes in broiler chickens showing short or long tonic immobility. *Domestic Animal Endocrinology*, 47, 65-72.
- Warriss, P. D. (1998). The welfare of slaughter pigs during transport. *Animal Welfare*, 7(May), 365-381.
- Weerd, H. A. Van De, & Day, J. E. L. (2009). A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 1-20.
- Wills, E. D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *The Biochemical journal*, 99(3), 667-676.
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Wunsch, A. M., & Ferguson, S. M. (2015). The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience*, 301, 529-41.
- Yang, Y., Hanke, J. H., Carayannopoulos, L., Craft, C. M., Capra, J. D., & Tucker, P. W. (1993). NonO, a Non-POU-Domain-Containing, octamer-Binding Protein, Is the Mammalian Homolog of Drosophila nonA. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5593-5603.
- Zhu, J., Apparsundaram, S., Bardo, M. T., & Dwoskin, L. P. (2005). Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1434-1443.
- Ziegler, D. R., Cass, W. A., & Herman, J. P. (1999). Excitatory Influence of the Locus Coeruleus in Hypothalamic-Pituitary- Adrenocortical Axis Responses to Stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 11, 361-369.





# APÉNDICE 1



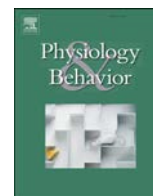
APÉNDICE 1

**Tabla 38.** Coeficientes de correlación de los parámetros medidos en el estudio 3. Los números en negrita indican correlaciones significativas ( $P < 0,05$ ). Las correlaciones positivas están en verde y las negativas en rojo. La intensidad del color representa la fuerza de la correlación, de  $R=1$  a  $R=-1$

		PFC			HC			HC	Serum					Saliva	Serum		PFC						HC							
		c-Fos	ERK1/2	CP	c-Fos	ERK1/2	CP	BDNF	Pig-MAP	Hp	CK	Cortisol	Cortisol	NA	A	NA	DA	HVA	Datotal	5-HIAA	5-HT	INDtotal	NA	DOPAC	DA	HVA	Datotal	5-HIAA	5-HT	INDtotal
PFC	c-Fos		0,26	-0,09	<b>-0,54</b>	<b>-0,46</b>	-0,08	0,14	0,00	-0,24	0,21	<b>-0,37</b>	<b>-0,31</b>	0,02	<b>-0,27</b>	<b>-0,24</b>	0,22	0,07	0,21	0,29	0,07	0,16	<b>-0,21</b>	<b>-0,07</b>	0,22	0,00	0,16	<b>-0,07</b>	0,24	0,21
	ERK1/2	0,26		-0,01	-0,10	<b>-0,32</b>	0,01	0,15	<b>-0,18</b>	-0,24	0,27	<b>-0,09</b>	0,16	<b>-0,09</b>	0,08	<b>-0,17</b>	0,37	<b>-0,13</b>	0,23	<b>-0,15</b>	<b>-0,36</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,22</b>	0,21	0,24	<b>-0,06</b>	0,17	0,19	<b>-0,05</b>	0,01
	CP	<b>-0,09</b>	<b>-0,01</b>		0,00	0,10	0,17	0,22	0,32	0,21	<b>-0,41</b>	0,30	<b>-0,01</b>	0,24	0,19	<b>-0,59</b>	<b>-0,77</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,60</b>	0,01	<b>0,48</b>	0,38	<b>-0,16</b>	<b>-0,03</b>	<b>-0,14</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,31</b>	<b>-0,18</b>	<b>-0,20</b>	<b>-0,25</b>
HC	c-Fos	<b>-0,54</b>	-0,10	0,00		<b>0,50</b>	-0,07	<b>-0,71</b>	-0,19	0,19	<b>0,45</b>	0,13	0,27	0,16	0,33	<b>0,48</b>	0,10	0,39	0,30	0,12	<b>-0,26</b>	<b>-0,15</b>	0,25	0,39	0,03	<b>0,40</b>	0,26	0,33	<b>-0,18</b>	<b>-0,10</b>
	ERK1/2	<b>-0,46</b>	<b>-0,32</b>	0,10	<b>0,50</b>		<b>-0,07</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,18</b>	-0,14	0,18	0,18	<b>-0,04</b>	0,19	0,38	0,40	0,07	0,22	0,27	0,05	<b>-0,08</b>	<b>-0,04</b>	0,24	0,23	0,31	0,35	<b>0,40</b>	0,09	<b>-0,55</b>	<b>-0,48</b>
	CP	<b>-0,08</b>	0,01	0,17	<b>-0,07</b>	<b>-0,07</b>		0,15	<b>-0,05</b>	<b>-0,08</b>	<b>-0,31</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,27</b>	<b>-0,20</b>	<b>-0,16</b>	<b>-0,08</b>	<b>-0,02</b>	0,08	0,09	<b>0,40</b>	0,25	0,35	<b>-0,26</b>	<b>-0,36</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,53</b>	0,03	<b>-0,13</b>
HC	BDNF	0,14	0,15	0,22	<b>-0,71</b>	<b>-0,45</b>	0,15		<b>-0,22</b>	<b>-0,15</b>	<b>-0,46</b>	0,32	0,09	<b>-0,30</b>	<b>-0,15</b>	<b>-0,56</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,36</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,20</b>	0,30	0,16	<b>-0,40</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,54</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,22</b>	0,21	0,14
Suero	Pig-MAP	0,00	-0,18	0,32	-0,19	-0,18	-0,05	-0,22		<b>0,55</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,38</b>	0,01	0,34	0,17	<b>-0,49</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,48</b>	<b>-0,64</b>	-0,06	0,27	0,19	0,01	<b>-0,36</b>	<b>-0,26</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,36</b>	-0,08	0,07	0,03
	Hp	-0,24	-0,24	0,21	0,19	-0,14	-0,08	-0,15	<b>0,55</b>		<b>-0,41</b>	-0,08	0,08	-0,05	0,21	<b>-0,21</b>	<b>-0,49</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,63</b>	-0,28	0,33	0,15	-0,18	-0,15	<b>-0,50</b>	-0,30	<b>-0,50</b>	-0,08	0,25	0,19
	CK	0,24	0,27	<b>-0,41</b>	<b>0,45</b>	0,18	-0,31	<b>-0,46</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,41</b>		0,02	0,10	0,25	-0,05	<b>0,68</b>	<b>0,54</b>	<b>0,63</b>	<b>0,74</b>	0,07	<b>-0,45</b>	<b>-0,32</b>	-0,18	-0,15	<b>0,50</b>	<b>0,74</b>	<b>0,76</b>	0,34	<b>-0,14</b>	<b>-0,03</b>
	Cortisol	<b>-0,37</b>	<b>-0,09</b>	0,30	0,13	0,18	-0,01	0,32	<b>-0,38</b>	<b>-0,08</b>	0,02		<b>0,46</b>	0,05	0,04	0,16	<b>-0,26</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,06</b>	0,00	0,27	0,20	<b>-0,06</b>	0,25	<b>-0,03</b>	<b>-0,23</b>	<b>-0,05</b>	<b>-0,05</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,47</b>
Saliva	Cortisol	<b>-0,31</b>	0,16	-0,01	0,27	<b>-0,04</b>	<b>-0,27</b>	0,09	0,01	0,08	0,10	<b>0,46</b>		0,04	-0,03	-0,13	0,01	0,10	-0,13	-0,07	<b>-0,09</b>	-0,10	-0,13	0,18	<b>-0,09</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,08</b>	0,28	<b>-0,40</b>	<b>-0,26</b>
Suero	NA	0,02	-0,09	0,24	0,16	0,19	-0,20	-0,30	0,34	-0,05	0,25	0,05	0,04		<b>0,50</b>	0,23	-0,05	0,35	0,12	0,10	-0,05	0,00	0,37	<b>0,46</b>	0,20	0,25	<b>0,47</b>	0,03	<b>-0,28</b>	<b>-0,26</b>
	A	<b>-0,27</b>	0,08	0,19	0,33	0,38	-0,16	-0,15	0,17	0,21	-0,05	0,04	-0,03	<b>0,50</b>		0,13	0,05	0,00	0,03	<b>-0,37</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,48</b>	0,35	<b>-0,07</b>	0,11	0,28	0,20	0,12	0,16
PFC	NA	-0,24	-0,17	<b>-0,59</b>	<b>0,48</b>	0,40	-0,08	<b>-0,56</b>	<b>-0,49</b>	-0,21	<b>0,68</b>	0,16	-0,13	0,23	0,13		<b>0,59</b>	<b>0,73</b>	<b>0,72</b>	0,07	<b>-0,20</b>	<b>-0,14</b>	<b>0,49</b>	<b>0,68</b>	0,14	<b>0,62</b>	<b>0,55</b>	0,35	0,04	0,15
	DA	0,22	0,37	<b>-0,77</b>	0,10	0,07	-0,02	-0,28	<b>-0,46</b>	<b>-0,49</b>	<b>0,54</b>	<b>-0,26</b>	0,01	-0,05	0,05	<b>0,59</b>		<b>0,54</b>	<b>0,88</b>	0,24	<b>-0,41</b>	<b>-0,22</b>	0,25	0,27	<b>0,48</b>	<b>0,58</b>	<b>0,62</b>	0,22	-0,01	0,06
	HVA	0,07	-0,13	<b>-0,38</b>	0,39	0,22	0,08	-0,36	<b>-0,48</b>	<b>-0,46</b>	<b>0,63</b>	0,01	0,10	0,35	0,00	<b>0,73</b>	<b>0,54</b>		<b>0,79</b>	<b>0,41</b>	<b>-0,12</b>	0,07	0,36	<b>0,44</b>	0,35	<b>0,67</b>	<b>0,60</b>	-0,01	-0,06	-0,03
	Datotal	0,21	0,23	<b>-0,60</b>	0,30	0,27	0,09	-0,34	<b>-0,64</b>	<b>-0,63</b>	<b>0,74</b>	-0,06	-0,13	0,12	0,03	<b>0,72</b>	<b>0,88</b>	<b>0,79</b>		0,38	<b>-0,37</b>	<b>-0,15</b>	0,28	<b>0,42</b>	<b>0,57</b>	<b>0,72</b>	<b>0,76</b>	0,13	-0,13	-0,07
	5-HIAA	0,29	-0,15	0,01	0,12	0,05	<b>0,40</b>	-0,20	-0,06	-0,28	0,07	0,00	-0,07	0,10	<b>-0,37</b>	0,07	0,24	<b>0,41</b>	0,38			<b>0,41</b>	<b>0,70</b>	-0,07	-0,18	0,22	0,11	0,12	-0,38	-0,18
5-HT	0,07	-0,36	<b>0,48</b>	-0,26	-0,08	0,25	0,30	0,27	0,33	<b>-0,45</b>	0,27	-0,09	-0,05	-0,22	-0,20	<b>-0,41</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,41</b>			<b>0,94</b>	-0,21	-0,38	-0,05	<b>-0,41</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,36</b>	-0,01	-0,11
INDtotal	0,16	-0,34	0,38	-0,15	-0,04	0,35	0,16	0,19	0,15	<b>-0,32</b>	0,20	-0,10	0,00	<b>-0,32</b>	-0,14	<b>-0,22</b>	0,07	-0,15	<b>0,70</b>	<b>0,94</b>			-0,19	<b>-0,36</b>	0,05	<b>-0,28</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,43</b>	-0,08	-0,20
HC	NA	-0,21	-0,22	-0,16	0,25	0,24	-0,26	<b>-0,40</b>	0,01	-0,18	0,33	-0,06	-0,13	0,37	<b>0,48</b>	<b>0,49</b>	0,25	0,36	0,28	-0,07	-0,21	-0,19		<b>0,43</b>	0,16	<b>0,47</b>	<b>0,51</b>	0,33	0,29	0,37
	DOPAC	-0,07	0,21	-0,03	0,39	0,23	-0,36	-0,29	-0,36	-0,15	<b>0,67</b>	0,25	0,18	<b>0,46</b>	0,35	<b>0,68</b>	0,27	<b>0,44</b>	<b>0,42</b>	-0,18	<b>-0,38</b>	<b>-0,36</b>	<b>0,43</b>		0,28	<b>0,43</b>	<b>0,66</b>	0,24	-0,24	-0,15
	DA	0,22	0,24	-0,14	0,03	0,31	-0,34	-0,19	-0,26	<b>-0,50</b>	<b>0,50</b>	-0,03	-0,09	0,20	-0,07	0,14	<b>0,48</b>	0,35	<b>0,57</b>	0,22	-0,05	0,05	0,16	0,28		<b>0,65</b>	<b>0,81</b>	0,23	<b>-0,46</b>	<b>-0,35</b>
	HVA	0,00	-0,06	<b>-0,46</b>	<b>0,40</b>	0,35	-0,38	<b>-0,54</b>	-0,29	-0,30	<b>0,74</b>	<b>-0,23</b>	-0,22	0,25	0,11	<b>0,62</b>	<b>0,58</b>	<b>0,67</b>	<b>0,72</b>	0,11	<b>-0,41</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,47</b>	<b>0,43</b>	<b>0,65</b>		<b>0,81</b>	0,19	<b>-0,11</b>	-0,04
	Datotal	0,16	0,17	-0,31	0,26	<b>0,40</b>	-0,34	-0,40	-0,36	<b>-0,50</b>	<b>0,76</b>	-0,05	-0,08	<b>0,47</b>	0,28	<b>0,55</b>	<b>0,62</b>	<b>0,60</b>	<b>0,76</b>	0,12	<b>-0,34</b>	<b>-0,22</b>	<b>0,51</b>	<b>0,66</b>	<b>0,81</b>	<b>0,94</b>		0,22	-0,31	-0,22
5-HIAA	-0,07	0,19	-0,18	0,33	0,09	<b>-0,53</b>	-0,22	-0,08	-0,08	0,34	-0,05	0,28	0,03	0,20	0,35	0,22	-0,01	0,13	-0,38	<b>-0,36</b>	<b>-0,43</b>	0,33	0,24	0,23	0,19	0,22		0,12	<b>0,41</b>	
5-HT	0,24	-0,05	-0,20	-0,18	<b>-0,55</b>	0,03	0,21	0,07	0,25	-0,14	<b>-0,51</b>	<b>-0,40</b>	-0,28	0,12	0,04	-0,01	-0,06	-0,13	-0,18	-0,01	-0,08	0,29	-0,24	<b>-0,46</b>	-0,11	-0,31	0,12		<b>0,96</b>	
INDtotal	0,21	0,01	-0,25	-0,10	<b>-0,48</b>	-0,13	0,14	0,03	0,19	-0,03	<b>-0,47</b>	-0,26	-0,26	0,16	0,15	0,06	-0,03	-0,07	-0,28	-0,11	-0,20	0,37	-0,15	-0,35	-0,04	-0,22	<b>0,41</b>	<b>0,96</b>		



# APÉNDICE 2



## Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour



Laura Arroyo<sup>a</sup>, Ricard Carreras<sup>b</sup>, Daniel Valent<sup>a</sup>, Raquel Peña<sup>a,c</sup>, Eva Mainau<sup>d</sup>, Antonio Velarde<sup>b</sup>, Josefa Sabrià<sup>e</sup>, Anna Bassols<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>b</sup> IRTA, Animal Welfare Subprogram, Veïnat de Sies, s/n, 17121 Monells, Spain

<sup>c</sup> Servei de Bioquímica Clínica Veterinària, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>d</sup> Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>e</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

### HIGHLIGHTS

- We measured brain neurotransmitters in pigs classified as fearful-nonfearful under stressful handling.
- Stressful handling alters the 5-HT system in the hippocampus and the amygdala.
- There was no difference between fearful and non-fearful pigs under non-stressful handling.
- The 5-HT pathway is activated in the hippocampus under stressful handling only in fearful pigs.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2016

Received in revised form 26 August 2016

Accepted 7 October 2016

Available online 11 October 2016

#### Keywords:

Brain

Dopamine

Pig

Serotonin

Stress

Tonic immobility

### ABSTRACT

Chemical neurotransmitters (NT) are principal actors in all neuronal networks of animals. The central nervous system plays an important role in stress susceptibility and organizes the response to a stressful situation through the interaction of the dopaminergic and the serotonergic pathways, leading to the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA). This study was designed to investigate: a) the effects of stressful handling of pigs at the slaughterhouse on the neurotransmitter profile in four brain areas: amygdala, prefrontal cortex (PFC), hippocampus and hypothalamus, and b) whether the alterations in the brain NT profile after stressful handling were associated with fear, determined by the tonic immobility (TI) test. In the first place, the characterization of the NT profile allowed to distinguish the four brain areas in a principal component analysis. The most crucial pathway involved in the reaction of pigs to a stressful handling was the serotonergic system, and changes were observed in the amygdala with a decrease in serotonin (5-HT) and total indoleamines, and in the hippocampus, where this pathway was activated. Fearful and non-fearful pigs did not show significant differences in their NT profile in control conditions, but when subjected to a stressful handling in the slaughterhouse, fearful animals showed a significant variation in the serotonin pathway and, in a lesser extent, the dopamine (DA) pathway. In conclusion, the existence of an underlying biological trait - possibly fearfulness - may be involved in the pig's response toward stressful challenges, and the serotonergic system seems to play a central role in this response.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chemical neurotransmitters (NT) are principal actors in all neuronal operations. The noradrenergic, dopaminergic and the serotonergic pathways are the most important and well characterized systems underlying the response to stress, fear and reward, among others. The central nervous system controls the action of endocrine glands through the

release of catecholamines, indoleamines and other transmitters which can be excitatory or inhibitory mediators [1]. Amygdala, hippocampus and prefrontal cortex (PFC) are recognized to play a role in the stress response organization. In these structures, stressors produce changes in extracellular concentrations of different NTs leading to activation and modulation of processes to cope with stress. These areas have an indirect output to the hypothalamus, which acts modulating the final stress response through the sympathetic nervous system and the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [2]. Therefore, the stress response involves not only the activity of these specific brain areas, but also the interaction among those areas through neuromodulators,

\* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.  
E-mail address: [anna.bassols@uab.cat](mailto:anna.bassols@uab.cat) (A. Bassols).

especially catecholamines (noradrenaline (NA), dopamine (DA)) and the indoleamine serotonin (5-HT). DA is metabolized to homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), whereas 5-HT is metabolized to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) [1]. Determining the ratios between the amine and its metabolites can indicate the turnover rate [3].

Tonic immobility (TI) is a well-established test to evaluate the fear response in a wide range of vertebrates and invertebrates [4,5]. Long duration of TI is generally considered as an indication for high levels of fearfulness associating tonic immobility with emotional components like fear or anxiety [6] and with a fear-related phenotype [7]. In pigs, the TI test has shown to be consistent with other behavioural tests carried out at different ages assessing fear, aggressiveness and behavioural strategies in front of a stressful situation, thus indicating that it may be related to individual personality characteristics [4,8–15]. A positive relationship has been reported between TI scores and lean meat percentage, and a genetic background has been suggested [8,9]. Furthermore, the fear-related behaviour is closely associated with the stress response regulated by the HPA axis [7,16].

There are several stressors widely recognized and studied in pigs, such as handling, mixing, transport and slaughter [17]. One of the main consequences of pre-slaughter stress is the production of pale, soft and exudative (PSE) meat, leading to an organoleptic and economic cost [18]. In the literature, changes in brain NT profiles in genetically stress-susceptible pigs have been reported [19]. Immobilization of pigs produces changes in hypothalamic and/or hippocampal bioamine levels, suggesting an important role of these regions in the responsiveness of the pig to acute stress conditions [3,20]. Furthermore, the involvement of central nervous system NT in aggressiveness and dominance has also been studied [21–24]. However, changes in brain NT related to standard or commercial stress conditions at slaughter and the fear-related behaviour have been rarely studied in pigs [25].

In the present study, we have first characterized the NT profile of catecholamines and indoleamines in four different brain areas of the pig involved in the stress and fear response: amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus. Secondly, we have analyzed the changes in NT profile in pigs subjected to stress at slaughter classified according to a fear-related phenotype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, housing conditions, general procedure and ethical statement

This study was carried out at the IRTA-Monells experimental farm (Monells, Spain). Ninety-two male piglets were randomly allocated in 10 housing groups of 10–12 piglets each in the pre-control building at 3 weeks of age (mean  $\pm$  SE:  $5.85 \pm 0.166$  kg). All piglets came from the same commercial farm and were crosses of Large White  $\times$  Landrace Halothane gene-RYR(1)-free (NN) sows with Pietrain heterozygous (Nn) terminal sire. At 4 weeks of age, all piglets were subjected to a TI test in order to select a total of 36 piglets (18 positive to TI and 18 negative to TI, see Section 2.2). At 8 weeks of age, pigs were moved to the control building and randomly allocated in four groups of nine.

Each group was housed in slatted pens (5 m  $\times$  2.70 m) under natural light conditions at a constant environmental temperature of  $22 \pm 3$  °C. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 cm  $\times$  16 cm) connected to a nipple and a concrete feeder (58 cm  $\times$  34 cm) with 4 feeding places. Pigs had water and food ad libitum. The pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental period. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

### 2.2. Tonic immobility test

Piglets were subjected to a TI test adapted from Erhard et al. [10] and de Sevilla et al. [8]. An experimenter restrained individually each piglet

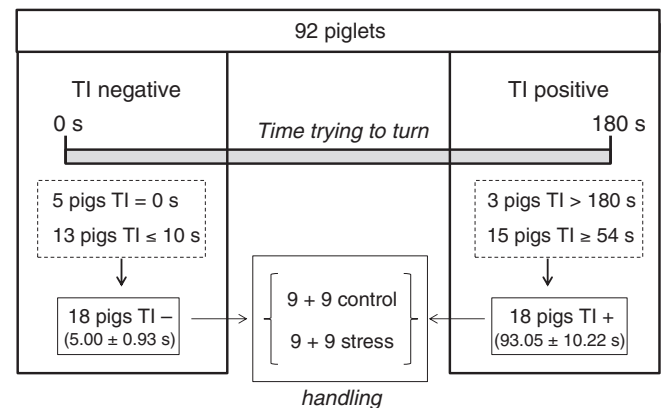
in a dorsal decubitus position using a V-shaped wooden restrain (50 cm long and with an 80° angle). Another experimenter placed a small bag (15 cm  $\times$  20 cm and weighing 500 g) over the piglet's throat with one hand, while carefully holding the hind legs with the other until the animal remained immobile. Only one induction was performed and the time between the experimenter's hands were removed from the animal's hind legs and the time that the piglet tried to turn was recorded. If the piglet did not try to turn within 3 min, the trial finalized, and the time of 180 s was assigned to this piglet. Otherwise, piglets that did not show the immobility response because they struggled while they were being placed onto the V-shaped wooden restrain were assigned a time of 0 s. The 18 piglets with the lowest time (less than or equal to 10 s) to try to turn were chosen and classified as negative to TI test and the 18 piglets with the highest time (equal to or  $>54$  s) to try to turn were also selected and classified as positive to TI test. An outline of the experimental design and the distribution of TI negative and TI positive animals is shown in Fig. 1.

### 2.3. Housing and slaughtering conditions

Animals aged 24 weeks were fasted 8 h before being transported from the experimental farm to the experimental slaughterhouse (1.2 km of distance). "Control" and "stress" conditions included different management during unloading, lairage and conduction to the stunning area. During the unloading, the pigs of two housing pens (9 TI-negative, 9 TI-positive) were subjected to stress by noise, human presence and rough handling (simulating commercial conditions) whereas the pigs of the other two housing pens (9 TI-negative, 9 TI-positive) were handled very calmly allowing the time need for the animals to go ahead by themselves. Pigs were located in the lairage pens for an hour, the 18 animals under stressful conditions were mixed between the two housing groups, whereas the 18 animals under control conditions remained separated maintaining the housing groups. The management during the conduction of the pigs to the stunning area was similar to the management during unloading (control or stress). The total length of the procedure was approximately 90 min. Animals were stunned in groups of two by exposure to 90% CO<sub>2</sub> at atmospheric air for 3 min and exsanguinated afterwards.

### 2.4. Tissue sampling and neurotransmitter quantification

Immediately after the slaughter ( $\approx 5$  min) the skull was opened. The brain was removed and tissue samples from the selected brain structures (amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus) were excised, collected as quickly as possible (within 90 s) in liquid N<sub>2</sub> and kept frozen



**Fig. 1.** Outline of the experimental design and the distribution of TI negative and TI positive animals. Ninety-two pigs were subjected to the TI test with a maximum allowed time of 180 s. Three pigs did not turn (TI positive) and five moved immediately (time = 0 s, TI negative). The animals showing the most extreme responses in reaction time were selected to be included in the study (18 animals for each group).



at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until NT analysis according to a procedure adapted from Sabrià et al. [26]. Samples were weighted and homogenized (1:10 w/v) in ice-cold 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  and 0.25 M ethylenediaminetetraacetate (EDTA). Dihydroxybenzylamine (DHBA) and  $\text{N}\omega$ -metil-5-hydroxytryptamine ( $\text{N}\omega$ ) were added as internal standards for catecholamines and indoleamines, respectively. The mixtures were homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) followed by centrifugation at 3000g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation at 12,000g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the concentration of catecholamines (NA, DA, DOPAC and HVA) and indoleamines (5-HT and 5-HIAA) were determined in 20  $\mu\text{L}$  aliquots using HPLC (Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Japan) equipped with a Chromolith Rp-18e  $100 \times 4.6$  mm column (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA). The mobile phase consisted of 0.5 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS) and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 400 mV and the flow rate was 1 mL/min.

The chromatographic quantification of dopaminergic and serotonergic NTs showed a good precision, with coefficient of variation between-days and within-days lower than 4%. Linearity was evaluated between 2.5 and 80  $\text{pg}/\mu\text{L}$  for 5-HT, 5–160  $\text{pg}/\mu\text{L}$  for  $\text{N}\omega$ , 5–240  $\text{pg}/\mu\text{L}$  for HVA and 2.5–120  $\text{pg}/\mu\text{L}$  for the rest of NTs. Coefficients of determination ( $R^2$ ) were calculated and found to be higher than 0.999 for all analytes. Limit of detection was between 2.14 and 4.97  $\text{pg}/\mu\text{L}$  and the limit of quantification was between 6.48 and 15.06  $\text{pg}/\mu\text{L}$  for all the analytes. The internal controls (DHBA and  $\text{N}\omega$ ) allowed the comparison between runs.

Total content of catecholaminergic and serotonergic pathways and ratios of DOPAC and HVA to DA, and 5-HIAA to 5-HT were estimated as a measure of DA and 5-HT turnover or rate metabolism in these brain regions.

## 2.5. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out with the Statistical Analyses System (SAS V9.2; software SAS Institute Inc., Cary, NC; 2002–2008). The significance level was established at  $P < 0.05$  and a tendency was considered at  $0.05 \leq P \leq 0.1$ . Descriptive data are presented with the means and the standard error (mean  $\pm$  SE).

Whenever possible, data was log transformed to correct the distribution and hence permit use of parametric statistics. Normality test of data and residuals was performed for each measure. Normally distributed measures were analyzed using the MIXED procedure of SAS with Tukey adjustment. Measures with Poisson or multinomial distributions were analyzed using the GENMOD procedure of SAS. In all models, each pig was introduced as the experimental unit, the fixed effects included were type of handling and immobility test and planned pair-wise comparisons with Bonferroni correction were performed.

### 2.5.1. Factor analysis

Interrelations among the seven neurotransmitters were included in a common factor analysis using principal component solution (PCA) to identify unobserved common factors that explain differences between regions. The criteria used to determine the number of factors to retain were: (a) eigenvalues  $> 1$  and (b) total variance accounted  $> 60\%$ . After the initial factor extraction, the matrix was orthogonally rotated (varimax method) to maintain factors independent and uncorrelated. Thus, each variable had a high loading (correlation coefficient between variables and factors) on a single factor and a small or moderate loading on other factors, using 0.5 loading in absolute value as cut-off point to accept a variable into a factor.

Each brain region of each pig obtained an individual score on each factor. Factor scores were normally distributed with a mean of zero.

## 3. Results

### 3.1. Tonic immobility test

The mean time of the 92 piglets to turn was  $34.80 \pm 3.77$  s. Five of the 92 piglets (5.43%) did not show immobility response therefore they were classified as negative to TI. Three of the 92 animals (3.26%) did not turn during the 3 min of the test and were classified as positive to TI. Since this was not enough to build groups with the required sample size, the 18 individuals with the most extreme behaviours were chosen. The mean time of the animals negative to TI and positive to TI was  $5.00 \pm 0.93$  s and  $93.05 \pm 10.22$  s, respectively, thus both groups were considerably apart (Fig. 1). Long duration of TI is considered as an indication for high levels of fearfulness, thus negative pigs to TI were classified as non-fearful animals and positive pigs as fearful animals.

### 3.2. Levels of brain amines and their metabolites in amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus

Table 1 shows the regional distribution of catecholamines and indoleamines in the four brain regions. Highest concentrations of NA were found in the hypothalamus. The concentration of DA and its metabolites DOPAC and HVA were found to be highest in the amygdala and hypothalamus. The ratio DOPAC/DA and HVA/DA was highest in the PFC.

Regarding to indoleamines, the highest concentration of 5-HT was found in the amygdala and hypothalamus, whereas the ratio 5-HIAA/5-HT was similar in all structures.

Principal component analysis (PCA) reduced the seven variables (NA, L-DOPA, DOPAC, DA, HVA, 5-HIAA and 5-HT) to 2 common factors or principal components explaining 92.11% of the variance. The eigenvalues, the individual and cumulative percentage accounted and the varimax rotated factor loadings for each variable are shown in Table 2. Brain regions with a high score for factor 1 (PC1) had high levels of DOPAC, DA, HVA, 5-HIAA and 5-HT; and brain regions with a high score for factor 2 (PC2) had high levels of NA and L-DOPA.

The PCA score plot showed that the pattern of NTs was able to readily differentiate all four brain areas (Fig. 2).

### 3.3. Influence of handling stress at slaughter on brain NTs

The concentrations of brain monoamines in the amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus are presented in Table 3.

The handling stress group presented lower concentration of 5-HT ( $P = 0.044$ ), HVA ( $P = 0.028$ ) and a tendency for DA ( $P = 0.064$ ) in the amygdala. As a consequence, a decrease in total indole content was observed in this area ( $P = 0.043$ ). In the hippocampus, the concentration of 5-HIAA ( $P = 0.031$ ), 5-HT ( $P = 0.054$ , tendency) and total indole content ( $P = 0.024$ ) was found to be higher in animals exposed to handling stress. Catecholamine levels did not show difference between handling groups, but an increase in the ratio indole/catecholamine ( $P = 0.012$ ) was found in this area. In the hypothalamus, an increase in HVA ( $P = 0.017$ ) and in the sum of the metabolites DOPAC + HVA ( $P = 0.020$ ) was observed in stressed pigs. Finally, no difference in any monoamine and their metabolites was found in the PFC.

To find out whether the fearful individuals (TI positive) showed a higher response to a stressful situation in the slaughterhouse, pair-wise comparisons were performed within handling groups (Table 4). Indeed, there were no differences in the NT profile between fearful and non-fearful groups in the control situation. In contrast, significant differences were found between TI positive and TI negative groups when stressfully handled at the slaughterhouse. Fearful animals show an increase in total catecholamines ( $P = 0.047$ ), 5-HT ( $P = 0.030$ ) and a tendency for total indoleamines ( $P = 0.063$ ) in the hippocampus and a tendency to increase L-DOPA ( $P = 0.090$ ) in the hypothalamus compared to non-fearful animals.

**Table 1**  
Concentration of neurotransmitters (ng/g tissue) in brain areas.

	Amygdala		PFC		Hippocampus		Hypothalamus	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
NA	152.50	9.37	144.39	4.00	130.48	5.03	2007.19	83.77
L-DOPA	—	—	—	—	—	—	309.91	18.73
DOPAC	43.65	4.04	7.28	0.86	—	—	59.40	7.19
DA	359.69	24.42	19.95	1.31	27.52	2.63	302.27	15.05
HVA	280.27	18.39	61.45	4.93	—	—	295.61	22.09
Total catecholamines	860.48	40.86	232.62	11.13	154.81	5.31	2911.25	103.77
5-HIAA	270.97	13.22	111.10	5.16	129.74	5.41	373.24	23.09
5-HT	917.38	47.35	252.71	10.79	276.56	9.83	995.47	51.79
Total indoleamines	1188.35	58.29	363.81	14.66	406.30	13.65	1368.71	70.88
5-HIAA/5-HT	0.31	0.01	0.45	0.02	0.48	0.02	0.08	0.02
DOPAC/DA	0.11	0.01	0.37	0.04	—	—	0.19	0.02
HVA/DA	0.91	0.09	3.34	0.24	—	—	1.03	0.09
NA/DA	0.83	0.38	8.39	0.63	6.55	0.91	6.94	0.33
(DOPAC + HVA)/DA	0.97	0.04	3.83	0.27	—	—	1.28	0.12
DOPAC + HVA	330.88	19.84	67.41	5.81	—	—	335.77	26.89
Indoleamines/catecholamines	1.452	0.05	1.79	0.12	2.68	0.126	0.48	0.02

#### 4. Discussion

Following classical neurology, the neural pathways controlling response to stress, fear, aggression, emotion, decision-making and other behaviours are allocated in specific brain areas such as the amygdala, the hippocampus and the PFC [27–32]. They process sensory information to organize the autonomic response to stimuli from the environment or from internal cues and, in particular, these areas are involved in the control of stress and the regulation of the HPA axis [33]. Catecholaminergic (NA, DA and their metabolites), and serotonergic (5-HT and 5-HIAA) systems play a significant role in integrating the activity and interaction among those areas [1,34].

In this work, we have shown that, together with the hypothalamus, these areas are characterized by a particular pattern of NT that clearly discriminates the four regions. In the PCA, component 2 (high concentrations of NA and L-DOPA) characterized the hypothalamus versus the other three areas, whereas the first component (high concentrations of the other NTs) characterized the amygdala versus PFC and hippocampus. These two areas were the most similar in their NT profile.

All three NT systems (noradrenergic, dopaminergic and serotonergic) have an important role in the control of the stress reaction [34]. Although, historically, the noradrenergic system in the *locus coeruleus* has attracted much attention in the study of the stress response, the dopaminergic and the serotonergic systems have also been consistently implicated [35]. In particular, 5-HT has remarkable modulatory effects in almost all central nervous system integrative functions, such as stress, mood, anxiety and aggression [36] and it has been recognized as being directly related to stress and able to regulate the HPA axis by stimulating CRH release in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [37].

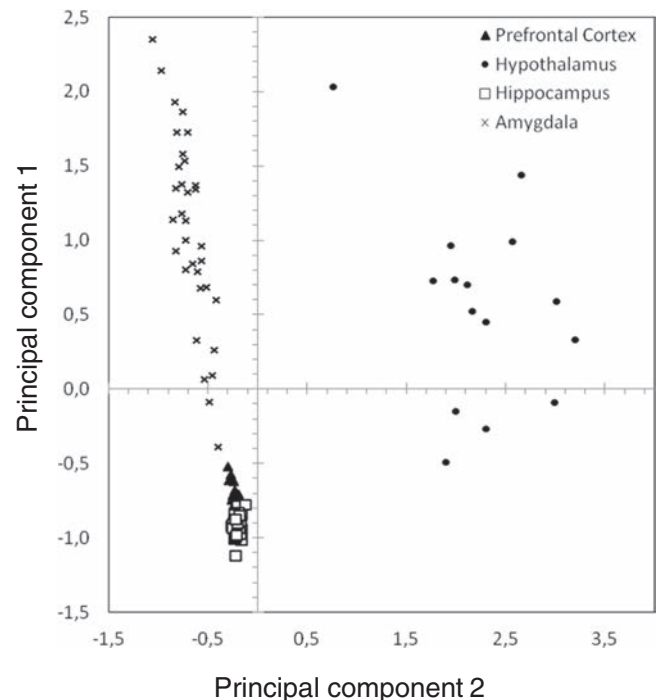
**Table 2**

Eigenvalues, individual and cumulative proportion of the correlation matrix and loadings of neurotransmitters in varimax rotated factor matrix. Loadings equals or higher than 0.50 are in bold to indicate the main attributes of the different principal components (PC).

	PC1	PC2
Eigenvalue	5.053	1.395
Individual Proportion	72.19%	19.92%
Cumulative Proportion	72.19%	92.11%
Variables		
NA	0.23	<b>0.97</b>
L-DOPA	0.22	<b>0.97</b>
DOPAC	<b>0.90</b>	0.28
DA	<b>0.95</b>	0.11
HVA	<b>0.93</b>	0.18
5-HIAA	<b>0.82</b>	0.46
5-HT	<b>0.91</b>	0.26

Marked changes in brain 5-HT turnover have been shown to occur in both rodents and humans upon activation of the HPA axis [38]. In particular, significant increases in the synthesis and release of 5-HT have been observed in various brain areas in response to different stressful conditions such as electrical foot shocks, cold environment, immobilization sessions, or tail pinches in rats [37]. All these data strongly support the existence of reciprocal relationships between the 5-HT system and the HPA axis.

The results presented here support the central role of the serotonergic pathway in the regulation of the short term reaction to acute stress in pigs. The most remarkable change induced by stressful handling at the slaughterhouse is the alteration of the serotonergic system in the hippocampus and in the amygdala. There is a decrease in the serotonin pathway (5-HT and total indoleamines, and a tendency for 5-HIAA) in the amygdala after acute handling stress. It is known that under stress conditions the *locus coeruleus* activates stress pathways in the amygdala



**Fig. 2.** Score plot from a principal component analysis showing the distribution of the four brain areas analyzed (amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus) regarding their NT profile.

**Table 3**  
Effects of stressful handling at the slaughterhouse on the neurotransmitter concentration (ng/g tissue) in amygdala, PFC, hippocampus and hypothalamus in pigs. Significant effects and tendencies are shown in bold. \*  $P < 0.05$ .

	Variables	Handling at slaughter				Effect
		Control		Stress		
		Mean	SE	Mean	SE	
Amygdala	NA	146.79	9.02	158.55	16.98	0.803
	DOPAC	47.38	5.79	39.17	5.54	0.319
	DA	403.52	32.34	313.27	34.20	<b>0.064</b>
	HVA	318.94	24.92	239.32	24.02	<b>0.028*</b>
	Total catecholamines	916.63	61.81	793.10	47.24	0.134
	5-HIAA	292.67	18.31	248.00	17.99	<b>0.092</b>
	5-HT	1009.16	57.02	820.20	70.74	<b>0.044*</b>
	Total indoleamines	1301.84	72.43	1068.20	84.90	<b>0.043*</b>
	5-HIAA/5-HT	0.29	0.01	0.32	0.02	0.336
	DOPAC/DA	0.11	0.01	0.11	0.01	0.917
	HVA/DA	0.83	0.06	1.00	0.18	0.614
	NA/DA	0.39	0.02	0.50	0.08	0.624
	(DOPAC + HVA)/DA	0.94	0.06	0.93	0.06	0.868
	DOPAC + HVA	366.32	28.82	291.00	24.11	<b>0.057</b>
	Indoleamines/catecholamines	1.48	0.08	1.42	0.07	0.642
	Prefrontal cortex	NA	139.11	5.77	150.80	5.10
DOPAC		7.61	1.24	6.87	1.21	0.830
DA		19.80	2.09	20.13	1.50	0.903
HVA		61.70	7.95	61.18	5.94	0.821
Total catecholamines		227.58	14.36	239.94	18.22	0.595
5-HIAA		107.83	6.38	114.57	8.33	0.418
5-HT		255.24	15.10	250.03	15.89	0.835
Total Indoleamines		363.07	20.01	364.60	22.18	0.964
5-HIAA/5-HT		0.43	0.02	0.47	0.03	0.322
DOPAC/DA		0.36	0.05	0.37	0.06	0.949
HVA/DA		3.30	0.32	3.40	0.37	0.846
NA/DA		8.33	0.94	8.47	0.80	0.676
(DOPAC + HVA)/DA		3.74	0.34	3.96	0.43	0.679
DOPAC + HVA		68.41	9.04	66.26	7.31	0.981
Indoleamines/catecholamines		1.74	0.11	1.85	0.26	0.838
Hippocampus		NA	134.21	5.84	126.75	8.27
	DA	28.86	4.19	26.18	3.29	0.619
	Total catecholamines	157.71	6.67	151.68	8.65	0.846
	5-HIAA	118.24	6.64	141.23	7.76	<b>0.031*</b>
	5-HT	257.78	11.78	295.35	14.68	<b>0.054</b>
	Total indoleamines	376.02	16.35	436.58	19.67	<b>0.024*</b>
	5-HIAA/5-HT	0.46	0.02	0.49	0.02	0.519
	NA/DA	6.47	1.25	6.63	1.39	0.979
	Indoleamines/catecholamines	2.39	0.14	3.00	0.18	<b>0.012*</b>
	NA	2116.99	135.36	1913.08	101.48	0.232
Hypothalamus	L-DOPA	308.07	25.13	311.92	29.23	0.921
	DOPAC	65.41	14.49	55.89	8.00	0.539
	DA	293.10	23.93	310.12	19.58	0.583
	HVA	240.94	20.37	338.56	32.17	<b>0.017*</b>
	Total catecholamines	2977.17	177.41	2854.74	122.88	0.567
	5-HIAA	352.19	27.54	390.07	35.51	0.426
	5-HT	967.30	71.29	1018.00	75.43	0.636
	Total indoleamines	1319.50	92.95	1408.07	105.42	0.545
	5-HIAA/5-HT	0.37	0.02	0.39	0.02	0.729
	DOPAC/DA	0.21	0.06	0.18	0.02	0.781
	HVA/DA	0.86	0.09	1.16	0.14	0.108
	NA/DA	7.47	0.44	6.48	0.46	0.343
	(DOPAC + HVA)/DA	1.02	0.14	1.41	0.16	0.132
	DOPAC + HVA	271.25	28.51	386.47	37.98	<b>0.020*</b>
	Indoleamines/Catecholamines	0.45	0.02	0.50	0.04	0.220

through noradrenergic projections. Likewise, the amygdala sends projections to the hypothalamus and brain stem, mediating the unconscious acute responses to danger and orchestrating the expression of behavioural and physiological responses (e.g. changes in heart rate, respiration and pupillary dilation) [35]. Thus, the amygdala and the hypothalamus are connected to innate (unconditioned) fear and may serve to enhance the state of arousal in order to adapt to challenging situations [39]. A decrease in 5-HT in the amygdala has been shown in rats subjected to forced swimming as a model of acute stress [40], although contradictory results have been reported that are probably explained by the existence of specific regions inside the amygdala with different functional roles [27].

The hippocampus is central to 5-HT function since it receives a dense projection of 5-HT fibres mainly from the *raphe nucleus* and it is rich in various 5-HT receptor types, being a mediator in the relationship of 5-HT with the HPA axis [32,37]. The increase of 5-HT (tendency) as well as its metabolite 5-HIAA induced by stressful handling indicates that this NT is synthesized and rapidly metabolized. This is in agreement with the general idea that only inescapable, but not escapable, stresses produce an increase in extracellular 5-HT concentration in rat hippocampus [37,41]. In rodents, many studies have demonstrated that 5-HT release is increased in the hippocampus during several stress conditions, including immobilization [42], psychological stress [43], exposure to cats, tail pinch and forced swimming [44] and footshock [45,46].



in the hippocampus. The hippocampus and the serotonergic system have been previously related to fear behaviour in pigs [50] and chicken [51]. In pigs, Ursinus et al. [50] recently reported that hippocampal 5-HT is positively correlated with standing alert time (freezing) and inversely correlated with locomotion and exploration in pigs subjected to a novel object test. Since freezing is a sign of fear and explorative behaviours are generally thought to reflect a low level of fear or anxiety, it is concluded that hippocampal 5-HT increases in a fear condition [52]. The authors did not find any relationship between behaviour in the novel object test and 5-HT levels in the PFC or in the hypothalamus. In agreement with these authors, our results support the hypothesis that the relations between behaviour and measures of 5-HT in brain indicate an underlying personality trait and that individual differences in behaviour of animals during environmental challenges may covary with the animal's serotonergic system functioning. It is also interesting to note that in Ursinus's work, hippocampal 5-HT activity measured at 19 weeks of age in euthanized animals was related to behaviours observed during the novelty test at 11 weeks of age [50]. Taken altogether, these results suggest that the hippocampus, but not other brain regions, might be involved in a putative personality measure in pigs related to the trait fearfulness, and that 5-HT would be the main neurotransmitter involved. In rats, a short lasting acute footshock session was able to induce a marked increase in 5-HT synaptic levels in the hippocampus as well as freezing and anxiety-related behaviours [46], and endogenous 5-HT seems to be responsible for the modulation of activity in the hippocampal pyramidal neurons linked to freezing behaviour [53]. Furthermore, mice with a genetic deletion of the serotonin 1A receptor (5-HT<sub>1A</sub>R) have been shown to be more fearful in a number of behavioural conflict tests, confirming the important role of this neurotransmitter and this receptor in modulating anxiety [29,54]. Thus, the role of the hippocampus and the serotonergic system in the fear-related responses to stressful challenges may be a general characteristic of animal species. Although our results indicate a principal role of 5-HT and the hippocampus, they also suggest the involvement of the catecholamine system, since total catecholamines are increased in this region.

It is interesting to speculate about the molecular changes that lead to variations in the NT concentration, taking into account that the methodological approach used in the present work measures the total amount of the NT. It is not possible in pigs to perform microdialysis experiments that would allow the direct measurement of extracellular NTs (presumably related to their presence at the synapsis) [55]. The mechanism involving NT release includes the synthesis of the NT by synthetic enzymes, their recruitment to vesicles and their release to the synaptic cleft [56]. Since we are measuring total content of NTs, rapid changes in total 5-HT concentration could be related to a change of tryptophan hydroxylase 2 activity (TPH2), the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in serotonin biosynthesis in the brain [57]. Current knowledge indicates that TPH2 is specifically transcribed in the somatodendritic segment of 5-HT neurons and a variable fraction of TPH2 mRNA is transported to terminal field [58]. A similar regulatory mechanism exists for tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme for the synthesis of catecholamines [59]. These enzymes can be rapidly transcribed in response to acute stress such as immobilization or other types of stress [27,60]. Other regulatory mechanisms that may be potentially involved are phosphorylation by protein kinase A (PKA) and the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II [61–63] and protein-protein interactions [59].

## 5. Conclusions

The most remarkable change induced by stressful handling is the alteration of the serotonergic system in the hippocampus and in the amygdala. There was no difference in neurotransmitter profile between fearful and non-fearful pigs when confronted to a non-stressful handling at the slaughterhouse, but fearful animals did show more changes

when subjected to stressful handling, concerning specially the serotonergic pathway in the hippocampus.

In conclusion, the existence of an underlying biological trait - possibly fearfulness - may be involved in pig's response toward stressful challenges, and the serotonergic system seems to be central to this response.

## Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. Mercedes Unzeta and Susana Benitez (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, UAB) for their help with the HPLC analysis and Anna Vilalta for her excellent technical assistance. This work was supported by grants AGL2010-21578-C03-01 and AGL2011-30598-C03-02 (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional [FEDER]), and grant 2014 SGR4 from the Generalitat de Catalunya.

## References

- [1] E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, S.A. Siegelbaum, A.J. Hudspeth, Principles of Neural Science, 5th edition McGraw-Hill Companies, Inc., 2013
- [2] F. Mora, G. Segovia, A. Del Arco, M. de Blas, P. Garrido, Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration, *Brain Res.* 1476 (2012) 71–85.
- [3] A.B. Piekarczywska, S.J. Rosochacki, G. Sender, The effect of acute restraint stress on regional brain neurotransmitter levels in stress-susceptible Pietrain pigs, *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 47 (2000) 257–269.
- [4] B. Forkman, A. Boissy, M.C. Meunier-Salaun, E. Canali, R.B. Jones, A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses, *Physiol. Behav.* 92 (2007) 340–374.
- [5] C.R.A. Leite-Panissi, A.A. Ferrarese, A.L.B. Terzian, L. Menescal-de-Oliveira, Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig, *Brain Res. Bull.* 69 (2006) 356–364.
- [6] L. De Oliveira, A. Hoffmann, L. Menescal-de-Oliveira, Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs, *Physiol. Behav.* 62 (1997) 1171–1178.
- [7] S. Wang, Y. Ni, F. Guo, Z. Sun, A. Ahmed, R. Zhao, Differential expression of hypothalamic fear- and stress-related genes in broiler chickens showing short or long tonic immobility, *Domest. Anim. Endocrinol.* 47 (2014) 65–72.
- [8] X.F. de Sevilla, J. Casellas, J. Tibau, E. Fàbrega, Consistency and influence on performance of behavioural differences in large white and landrace purebred pigs, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 117 (2009) 13–19.
- [9] E. van Erp-van der Kooij, A.H. Kuijpers, J.W. Schrama, E.D. Ekkel, M.J.M. Tielen, Individual behavioural characteristics in pigs and their impact on production, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 66 (2000) 171–185.
- [10] H.W. Erhard, M. Mendl, Tonic immobility and emergence time in pigs—more evidence for behavioural strategies, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 61 (1999) 227–237.
- [11] H.W. Erhard, M. Mendl, S.B. Christiansen, Individual differences in tonic immobility may reflect behavioural strategies, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 64 (1999) 31–46.
- [12] M.J.C. Hessing, A.M. Hagelso, J.A.M. van Beek, R.P. Wiepkema, W.G.P. Schouten, R. Krukow, Individual behavioural characteristics in pigs, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 37 (1993) 285–295.
- [13] N. Geverink, W.G. Schouten, G. Gort, V. Wiegant, Individual differences in behavioral and physiological responses to restraint stress in pigs, *Physiol. Behav.* 77 (2002) 451–457.
- [14] N.A. Geverink, M.J.W. Heetkamp, W.G.P. Schouten, V.M. Wiegant, J.W. Schrama, Backtest type and housing condition of pigs influence energy metabolism, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 1227–1233.
- [15] I. Reimert, J.E. Bolhuis, B. Kemp, T.B. Rodenburg, Social support in pigs with different coping styles, *Physiol. Behav.* 129 (2014) 221–229.
- [16] S. Hashimoto, T. Inoue, T. Koyama, Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 378 (1999) 23–30.
- [17] T. Grandin, Assessment of stress during handling and transport, *J. Anim. Sci.* 75 (1997) 249–257.
- [18] M. Gispert, L. Faucitano, M. Oliver, M. Guàrdia, A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs, *Meat Sci.* 55 (2000) 97–106.
- [19] O. Adeola, R.O. Ball, J.D. House, P.J. O'Brien, Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs, *J. Anim. Sci.* 71 (1993) 968–974.
- [20] S.J. Rosochacki, A.B. Piekarczywska, J. Polozynowicz, T. Sakowski, Genetic differences in brain monoamines level in Pietrain and Duroc pigs exposed to acute restraint stress, *J. Anim. Breed. Genet.* 120 (2003) 192–209.
- [21] R. Poletto, R.L. Meisel, B.T. Richert, H.-W. Cheng, J.N. Marchant-Forde, Aggression in replacement grower and finisher gilts fed a short-term high-tryptophan diet and

- the effect of long-term human–animal interaction, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122 (2010) 98–110.
- [22] R. Poletto, H.W. Cheng, R.L. Meisel, J.P. Garner, B.T. Richert, J.N. Marchant-Forde, Aggressiveness and brain amine concentration in dominant and subordinate finishing pigs fed the  $\beta$ -adrenoreceptor agonist ractopamine, *J. Anim. Sci.* 88 (2010) 3107–3120.
- [23] R. Poletto, H.-W. Cheng, R.L. Meisel, B.T. Richert, J.N. Marchant-Forde, Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a  $\beta$ -adrenoreceptor agonist, *Brain Res.* 1381 (2011) 11–20.
- [24] A. Valros, P. Palander, M. Heinonen, C. Munsterhjelm, E. Brunberg, L. Keeling, P. Piepponen, Evidence for a link between tail biting and central monoamine metabolism in pigs (*Sus scrofa domestica*), *Physiol. Behav.* 143 (2015) 151–157.
- [25] O. Adeola, R.O. Ball, Hypothalamic neurotransmitter concentrations and meat quality in stressed pigs offered excess dietary tryptophan and tyrosine, *J. Anim. Sci.* 70 (1992) 1888–1894.
- [26] J. Sabria, D. Torres, M. Pasto, J.M. Peralba, A. Allali-Hassani, X. Pares, Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex and hippocampus, *Addict. Biol.* 8 (2003) 287–294.
- [27] E. Asan, M. Steinke, K.-P. Lesch, Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety, *Histochem. Cell Biol.* 139 (2013) 785–813.
- [28] E.A. Antoniadis, R.J. McDonald, Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context, *Behav. Brain Res.* 108 (2000) 1–19.
- [29] P.R. Albert, F. Vahid-Ansari, C. Luckhart, Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 199, <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00199>.
- [30] P. Belujon, A.A. Grace, Hippocampus, amygdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216 (2011) 114–121.
- [31] P. Tovote, J.P. Fadok, A. Lüthi, Neuronal circuits for fear and anxiety, *Nat. Rev. Neurosci.* 16 (2015) 317–331.
- [32] E. Vermetten, J.D. Bremner, Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies, *Depress. Anxiety* 15 (2002) 126–147.
- [33] B.S. McEwen, The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance, *Brain Res.* 886 (2000) 172–189.
- [34] M. Joëls, T.Z. Baram, The neuro-symphony of stress, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 459–466.
- [35] P. Belujon, A.A. Grace, Regulation of dopamine system responsivity and its adaptive and pathological response to stress, *Proc. Biol. Sci.* 282 (2015) 20142516.
- [36] B. Olivier, Serotonin: a never-ending story, *Eur. J. Pharmacol.* 753 (2015) 2–18.
- [37] L. Lanfumey, R. Mongeau, C. Cohen-Salmon, M. Hamon, Corticosteroid–serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (2008) 1174–1184.
- [38] T.G. Dinan, Serotonin and the regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis function, *Life Sci.* 58 (1996) 1683–1694.
- [39] R. Adolphs, The biology of fear, *Curr. Biol.* 23 (2013) R79–R93.
- [40] L.G. Kirby, A.R. Allen, I. Lucki, Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid, *Brain Res.* 682 (1995) 189–196.
- [41] J. Amat, P. Matus-Amat, L.R. Watkins, S.F. Maier, Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat, *Brain Res.* 797 (1998) 12–22.
- [42] A. Vahabzadeh, M. Fillenz, Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis, *Eur. J. Neurosci.* 6 (1994) 1205–1212.
- [43] M. Matsuo, Y. Kataoka, S. Mataka, Y. Kato, K. Oi, Conflict situation increases serotonin release in rat dorsal hippocampus: in vivo study with microdialysis and Vogel test, *Neurosci. Lett.* 215 (1996) 197–200.
- [44] L.E. Rueter, B.L. Jacobs, A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations, *Brain Res.* 739 (1996) 57–69.
- [45] L.S. Wilkinson, T. Humby, S. Killcross, T.W. Robbins, B.J. Everitt, Dissociations in hippocampal 5-hydroxytryptamine release in the rat following Pavlovian aversive conditioning to discrete and contextual stimuli, *Eur. J. Neurosci.* 8 (1996) 1479–1487.
- [46] E. Hajos-Korcsok, D. Robinson, J. Yu, C. Fitch, Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74 (2003) 609–616.
- [47] F. Fraisse, J.F. Cockrem, Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens, *Br. Poultry Sci.* 47 (2006) 110–119.
- [48] U. Stockhorst, M.I. Antov, Modulation of fear extinction by stress, stress hormones and estradiol: a review, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 359, <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00359>.
- [49] A. Boissy, Fear and fearfulness in animals, *Q. Rev. Biol.* 70 (1995) 165–171.
- [50] W.W. Ursinus, J.E. Bolhuis, J.J. Zonderland, T.B. Rodenburg, A.S. de Souza, R.E. Koopmanschap, B. Kemp, G.A.H. Korte-Bouws, S.M. Korte, C.G. van Reenen, Relations between peripheral and brain serotonin measures and behavioural responses in a novelty test in pigs, *Physiol. Behav.* 118 (2013) 88–96.
- [51] R.L. Dennis, D.C. Lay, H.W. Cheng, Effects of early serotonin programming on behavior and central monoamine concentrations in an avian model, *Behav. Brain Res.* 253 (2013) 290–296.
- [52] S. Korte, S. De Boer, A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 163–175.
- [53] K. Tada, K. Kasamo, T. Suzuki, Y. Matsuzaki, Endogenous 5-HT inhibits firing activity of hippocampal CA1 pyramidal neurons during conditioned fear stress-induced freezing behavior through stimulating 5-HT1A, *Hippocampus* 14 (2004) 143–147.
- [54] C. Gross, L. Santarelli, D. Brunner, X. Zhuang, R. Hen, Altered fear circuits in 5-HT1A receptor KO mice, *Biol. Psychiatry* 48 (2000) 1157–1163.
- [55] B. Westerink, Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour, *Behav. Brain Res.* 70 (1995) 103–124.
- [56] S. Puglisi-Allegra, D. Andolina, Serotonin and stress coping, *Behav. Brain Res.* 277 (2015) 58–67.
- [57] M. Hale, A. Shekhar, C. Lowry, Development by environment interactions controlling tryptophan hydroxylase expression, *J. Chem. Neuroanat.* 41 (2011) 219–226.
- [58] L. Gutknecht, C. Kriegerbaum, J. Waider, A. Schmitt, Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19 (2009) 266–282.
- [59] S.C. Daubner, T. Le, S. Wang, Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 508 (2011) 1–12.
- [60] E. Sabban, R. Kvetňanský, Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events, *Trends Neurosci.* 24 (2001) 91–98.
- [61] I. Winge, J.A. McKinney, M. Ying, C.S. D'Santos, R. Kleppe, P.M. Knappskog, J. Haavik, Activation and stabilization of human tryptophan hydroxylase 2 by phosphorylation and 14-3-3 binding, *Biochem. J.* 410 (2008) 195–204.
- [62] D.M. Kuhn, S.A. Sakowski, T.J. Geddes, C. Wilkerson, J.W. Haycock, Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II, *J. Neurochem.* 103 (2007) 1567–1573.
- [63] N. Carkaci-Salli, U. Salli, I. Tekin, J.A. Hengst, M.K. Zhao, T.L. Gilman, A.M. Andrews, K.E. Vrana, Functional characterization of the S41Y (C2755A) polymorphism of tryptophan hydroxylase 2, *J. Neurochem.* 130 (2014) 748–758.

1 **Housing and Road Transport Modify the Neurophysiology of**  
2 **Pigs: Do Pigs Raised in Different Conditions Cope Differently**  
3 **with Unknown Environments?**

4

5 ***Short title:** Housing and Road Transport Modify the Neurophysiology of Pigs*

6

7 **Laura Arroyo<sup>a</sup>, Daniel Valent<sup>a</sup>, Ricard Carreras<sup>b</sup>, Raquel Peña<sup>a,c</sup>, Antonio**  
8 **Velarde<sup>b</sup>, Josefa Sabrià<sup>d</sup>, Anna Bassols<sup>a</sup>**

9

10

11 <sup>a</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de  
12 Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

13 <sup>b</sup>IRTA, Animal Welfare Subprogram, Veïnat de Sies, s/n, 17121 Monells, Spain

14 <sup>c</sup>Servei de Bioquímica Clínica Veterinària, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de  
15 Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

16 <sup>d</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina. Institut de Neurociències.  
17 Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

18

19

20

21 \* Corresponding author:

22 [anna.bassols@uab.cat](mailto:anna.bassols@uab.cat)

23

## 24 **Abstract**

25

26 How housing and transport conditions may affect welfare in porcine production is a leading topic in  
27 livestock research. An important issue is whether pigs reared in different housing systems cope  
28 differently with preslaughter stress. This study was designed to investigate whether the pigs present  
29 a different neurological response to different management conditions and to ascertain whether pigs  
30 living partially outdoors cope differently with road transport stress. Twenty-four female pigs at 22  
31 weeks of age were divided in two groups: one living indoors (ID, n=12) and the other housed  
32 combining indoor conditions with 4 hours per day of outdoor pasture (OD, n=12). After one month,  
33 one set of animals from each housing condition were driven in a truck to the slaughterhouse in 5 min  
34 drive (short transport group, ST, n=12) or in a 2 hours drive by a winding road (long transport group,  
35 LT group, n=12). At the slaughterhouse, blood and saliva were collected, and the prefrontal cortex  
36 (PFC) and the hippocampus (HC) dissected. Biochemical parameters were determined in serum and  
37 saliva and monoamine neurotransmitters (NTs) and molecular markers were analyzed in the PFC and  
38 HC. OD pigs had lower serum haptoglobin and Pig-MAP concentration and an increased  
39 dopaminergic pathway (DA-system) in the PFC, suggesting that living outdoors increases the well-  
40 being of the pigs. Long road transport increased serum creatine kinase (CK) and had an important  
41 effect on several brain parameters: the activation of the noradrenergic (NA-system) and DA -systems  
42 in the PFC and the activation of the DA-system and an increase in c-Fos amount as well as a decrease  
43 in BDNF in the HC. The serotonergic system (5-HT-system) was also altered in both cases, but with a  
44 mild effect. Multivariate analysis was able to discriminate the four animal groups. Globally, positive  
45 correlations are mainly observed between the NA and DA systems in both PFC and HC, together to  
46 serum catecholamines and CK; and negative correlations are observed between BDNF and NA-  
47 system, DA-system and c-Fos and ERK1/2 in the HC, NA-system in the PFC and serum CK. In  
48 conclusion, this work indicates that housing conditions and road transport markedly modifies the



49 neurophysiology of pigs, and suggest that the animals raised partially outdoors are more sensitive to  
50 long transport than animals raised indoors, suggesting that they cope differently with unknown  
51 environments.

52

53 **Keywords:** acute phase proteins, brain, dopamine, environmental enrichment, housing,  
54 noradrenaline, pig, road transport, serotonin, stress, welfare

55

## 56 Introduction

57

58 How housing and transport conditions may affect welfare in porcine production is a leading topic in  
59 livestock research. Whereas the behavioural effects of these conditions have been widely evaluated,  
60 there is a shortcoming of data about the biological effects of challenging living conditions, especially  
61 if they are compatible with actual management conditions. Outdoor pig production is an alternative  
62 to conventional systems and it may improve the welfare of the pigs since reduces the chronic stress  
63 usually associated with intensive production [1]. The major animal welfare advantage of outdoor  
64 production is the lack of behavioural restriction due to the larger space, environmental enrichment  
65 (EE) and diversity [2,3]. Furthermore, to the consumer, outdoor rearing presents a better image due  
66 to perceived better welfare and meat quality [4]. However, these animals might have to resist the  
67 rigours of the climate, like heat and cold [5].

68 Stress is defined as a behavioural, psychological and emotional status of an animal confronted with a  
69 situation perceived as threatening. There are several stressors widely recognized and studied in pigs,  
70 such as reallocation, mixing, transport and slaughter. Much effort has been made to reduce stress,  
71 improving animal welfare during the rearing period and also during slaughter, although it remains as  
72 an important issue in animal welfare and meat quality [6].

73 An important issue is whether pigs reared in different housing systems cope differently (and show  
74 different stress response) in front of the same preslaughter factors such as lorry loading and  
75 unloading, transport, lairage in a novel environment at the slaughterhouse and driving to the  
76 stunning area [7]. Some studies suggest that pigs from EE systems can cope better and react less  
77 adversely to preslaughter factors than pigs from intensive housing systems [4,5,8]. Other studies  
78 showed no effect of EE on physiological stress indicators although the housing conditions influenced  
79 animal activity during transport [7,9], and a number of studies have also suggested that outdoor pigs  
80 experienced greater pre-slaughter stress [5,10,11].

81

82 In the central nervous system (CNS), the dopaminergic and the serotonergic pathways are the most  
83 important and well characterized systems underlying the response to stress, fear, reward, etc [12].

84 Prefrontal Cortex (PFC) and hippocampus (HC) are recognized to play a role in stress response

85 organization [13,14]. These areas have an indirect output to the hypothalamus, which acts

86 modulating the final stress response through the sympathetic nervous system and the activation of

87 the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, that release catecholamines and cortisol to the

88 plasma, respectively [15,16]. Neurotransmitter systems, especially catecholamines (noradrenaline

89 (NA); adrenaline (A); dopamine (DA) and their metabolites, homovanillic acid (HVA) and 3,4-

90 dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), and the indoleamines serotonin (5-HT) and its metabolite 5-

91 hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), plays a significant role in integrating the activity and interactions

92 among those areas [12]. DA and 5-HT, amongst other NTs, activate the extracellular signal-regulated

93 kinases (ERK) cascade in the HC [17,18] and may serve as cross-talk tools between neurotrophins,

94 such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotransmitter systems [19,20]. One of the

95 downstream targets of these signalling pathways is the early-response gene *c-FOS* [18,21]. Sustained

96 expression of *c-FOS* has been observed in a variety of stressful conditions and *c-Fos* is widely used as

97 an activation signal [14,21], whereas activation of the ERK pathway has been proposed to underlie

98 the response to stress [22]. Moreover, chronic stressors may also cause oxidative stress in the CNS

99 leading to the oxidative damage of cellular macromolecules like proteins, promoting a pro-oxidative

100 state in the HC [13,14,23].

101 On the other side, positive conditions such as EE provoke changes in neuronal plasticity driven by

102 changes in neurotransmitters, neurotrophic factors, neurogenesis, etc. that are correlated to

103 behavioural changes, learning and memory [24,25]. In laboratory animals, modifications in the

104 monoamine NT profile linked to EE have been described. For example, EE alters the metabolism of

105 DA and 5-HT in the PFC [26–29] and the serotonergic pathway in the HC [30]. BDNF increases in EE

106 [31,32], whereas usually decreases in acute and chronic stress [33] and depressive-like behaviour

107 [20]. On the other hand, some studies state that EE attenuates pro-oxidative processes and triggers  
108 anti-oxidative defence mechanisms [32,34].

109  
110 In pigs, there are some studies leading with changes in brain NT profiles, mainly adrenergic,  
111 dopaminergic and serotonergic, related to stress and meat quality [35], immobilization stress [36,37],  
112 prenatal stress [38], dominance [39,40], tail biting [41], aggressiveness [42] and fear [43]. However,  
113 no studies have been performed in pigs related to NT and neurotrophin profile in EE conditions.

114  
115 Our research group has recently defined the changes provoked by management at the  
116 slaughterhouse in pigs and the relevance of them being fearful or not fearful individuals in the  
117 dopaminergic and serotonergic neurotransmitter profile in several brain regions [43]. In the present  
118 study, we have analyzed the changes in monoamine NT profile during road transport stress in pigs  
119 living totally indoors and partially outdoors. Secondly, we have determined several brain molecular  
120 markers, serum catecholamines and serum biochemical parameters related to physical damage and  
121 stress. The goal is to understand the neurological response to different management conditions and  
122 to ascertain whether pigs living partially outdoors cope differently with road transport stress than  
123 pigs in intensive conditions.

124

125

## 126 **Materials and methods**

127

### 128 **Experimental design**

129 In this study, 24 female pigs ((Landrace x Large White) x Piétrain) were used. At 9 weeks of age, pigs  
130 were transferred from a commercial farm to the experimental facilities of IRTA (Institut de Recerca i  
131 Tecnologia Agroalimentàries, Monells, Spain) and housed in 2 pens of 12 pigs each. Pens (5 x 2.7 m)

132 had fully slatted floor and were under natural light conditions at a constant environmental  
133 temperature ( $22 \pm 3$  °C). Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 x 16 cm) connected  
134 to a nipple and a concrete feeder (58 x 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and food ad  
135 libitum. Pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental  
136 period. At 22 weeks of age, one group remained in the conditions previously described (indoor-  
137 group, ID group, n = 12). The second group (outdoor-group, OD group, n = 12) was housed combining  
138 indoor conditions with 4 hours (from 9:00 until 13:00) of outdoor pasture. The outdoor pasture  
139 consisted in 250 m<sup>2</sup> of unpaved ground with mud and grass surrounded by a fence, with covered area  
140 to protect pigs from sun and access to a drinking point.

141 At 26 weeks of age, one set of animals (n = 12) from each housing condition (ID/OD, n = 6 for each  
142 group) were loaded in a truck and driven softly during 5 min to the experimental slaughterhouse 1.2  
143 km far away (short transport group, ST). The remaining animals (n=12, 6 of each ID/OD group) were  
144 taken to the slaughterhouse in a 2 hours drive by a winding road (long transport group, LT group). On  
145 arrival, all pigs were unloaded and immediately moved to a gas stunning system and exposed to 90 %  
146 CO<sub>2</sub> for 3 min before exsanguination. An outline of the experiment giving 4 groups in a 2x2 factorial  
147 design (IDST, ODST, IDLT and ODLT) is shown in Fig 1.

148 The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

149

150 **Fig 1. Outline of the experimental design.** Twenty four pigs at 22-week of age were divided in two  
151 groups: one group (ID, n=12) were housed indoors and the other group (OD, n=12) were left  
152 outdoors four hours per day. One month later, pigs were taken to the slaughterhouse by road  
153 transport in a short drive (ST, 5 min) or long drive (LT, 2 hours). At sacrifice, blood, saliva and brain  
154 regions were collected.

155

156 **Blood, saliva and brain sampling**

157 Just before the slaughter, saliva samples were collected by allowing pigs chew a cotton swab during  
158 approximately 30 s. The saliva was stored in Salivette tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and  
159 later centrifuged at 3000 x g for 10 min. Saliva samples were then collected and stored at -80°C until  
160 analysis.

161 Blood samples were collected at exsanguination from each pig in 10-mL tubes without anticoagulant.  
162 Blood was allowed to clot and serum was obtained by centrifugation at 2000 x g for 10 min and it  
163 was frozen at -80 °C until analysis.

164 Immediately, 5 min maximum after the slaughter, the skull was opened. The brain was removed and  
165 the HC and PFC were excised, collected as quickly as possible (90 s maximum) in liquid N2 and kept  
166 frozen at -80 °C.

167 All analytical procedures were performed in samples from all the individuals included in the study.

168

## 169 **Serum and saliva biochemistry**

170 Haptoglobin (Hp) was determined spectrophotometrically (Phase Haptoglobin, Tridelta Ltd, County  
171 Kildare, Ireland). Creatine kinase (CK) was determined with the IFCC method (OSR# 6179). Both  
172 techniques were adapted to the Olympus AU400 analyser. Pig-MAP was measured by ELISA  
173 (PigChamp ProEuropa, Segovia, Spain). Cortisol concentrations were determined by ELISA: DRG  
174 Cortisol ELISA for serum samples and DRG Salivary Cortisol ELISA for salivary samples (both from DRG  
175 Diagnostics, Marburg, Germany).

176

## 177 **Brain extracts preparation**

178 Brain samples (PFC and HC) were weighted and homogenized in ice-cold 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl  
179 pH 8.0 and 1.0 % Triton X-100 buffer with protease inhibitors (protease inhibitors cocktail, Sigma-  
180 Aldrich, St. Louis, MO) and dihydroxybenzylamine (DHBA) as internal standard (0.3 g of tissue/mL).

181 The mixtures were homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson  
182 Ultrasonics Corp., Danbury, CT) and the brain extracts were kept frozen in aliquots at -80 °C.

183

## 184 **Monoamine neurotransmitter quantification**

185 Brain extracts were homogenized (1:2) in ice-cold 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
186 and 0.25 M ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and kept frozen. After centrifugation at 12000 x g  
187 for 10 min at 4 °C, the concentration of catecholamines (NA, DA, DOPAC and HVA) and indoleamines  
188 (5-HT and 5-HIAA) were determined in 20 µL aliquots using HPLC (Elite LaChrom, Merck, Hitachi,  
189 Japan) equipped with a Chromolith Rp-18e 100 x 4.6 mm column (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)  
190 with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA). The mobile phase consisted  
191 of 0.5 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS) and 1 %  
192 acetonitrile. The applied voltage was set at 400 mV and the flow rate was 1 mL/min [44]. Validation  
193 of the methodology is described in Arroyo et al. [43] The internal control DHBA allowed the  
194 comparison between runs. Dopaminergic total system (DA-system) and serotonergic total system (5-  
195 HT-system) are calculated as the sum of all metabolites in the pathway (DA, DOPAC and DA; and 5-HT  
196 and 5-HIAA; respectively). Noradrenergic system (NA-system) is only composed by NA concentration.  
197

## 198 **Serum catecholamines**

199 Serum catecholamines were extracted following the procedure described by Caroldi et al. (1985).  
200 Approximately 10 mg of activated and acid washed alumina was added to 0.1 mL of serum with  
201 DHBA as an internal standard, followed by 0.5 ml of 1.5 M Tris buffer (pH 8.6 containing 0.07 M  
202 EDTA). Samples were shaken vigorously for 30 min, the alumina was precipitated by centrifugation at  
203 300 x g for 1 minute, washed by centrifugation two times with 1 mL of water. Catecholamines were  
204 eluted from the alumina by the addition of 100 µL of 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

205 and 0.25 M EDTA and centrifugation at 300 x g for 1 minute. NA and A concentrations were  
206 determined in 20  $\mu$ L aliquots using HPLC as described above.

207

## 208 **Immunoblotting**

209 Antibodies: anti-c-Fos and anti- $\beta$ -actin antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,  
210 CA, USA), anti-ERK1/2 was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and Anti-dinitrophenyl (DNP) was  
211 from Sigma (St. Louis, MO, USA). Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP-linked antibody was from Cell  
212 Signaling (Danvers, MA, USA) and sheep anti-mouse IgG HRP-linked whole antibody was from GE  
213 Healthcare (Buckinghamshire, UK).

214 Total protein concentration of brain samples was determined using the colorimetric Bio-Rad protein  
215 assay, based on the Bradford dye-binding method, according to kit instructions (Bio-Rad, München,  
216 Germany).

217 For Western Blot, 40  $\mu$ g of protein from HC and PFC extracts were resolved under reducing  
218 conditions in SDS-PAGE (12 % acrylamide) and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF)  
219 membranes (Immun-Blot PDVF, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 45 min at 300 mA in a semidry  
220 transferring system. Since several gels were run to process all samples, a unique brain sample was  
221 resolved in all SDS- PAGE as internal control to allow inter-gel comparison. Membranes were then  
222 blocked for 1 h at room temperature with 5 % fat-free milk in TBS-0.05 % Tween-20 (TBS-T).

223 Membranes were incubated with the diluted antibodies (1/200 for c-Fos detection and 1/2000 for  
224 ERK1/2, 1/10000 for  $\beta$ -actin) for 16 h at 4 °C (1 h at room temperature for  $\beta$ -actin), washed and  
225 further probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulin for 1 h at room  
226 temperature. Antibody binding was visualized by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare,  
227 Buckinghamshire, UK). Densitometry was performed in a LAS-3000 Luminiscent Image Analyzer with  
228 the Multi Gauge software (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). Standardization was performed  
229 against  $\beta$ -actin densitometry to correct for the protein content of the samples and against a control  
230 brain sample to correct inter-gel variation.



231 For protein carbonylation content (PC) detection, a Slot Blot was performed, as described in [46] with  
232 some modifications. Lysates from HC and PFC (5 µg) were applied to each slot. After an incubation of  
233 20 min, vacuum was applied until all the liquid above the PVDF membrane disappeared. Sequentially,  
234 the membrane was incubated for 1 min in MeOH, in Transfer Buffer (0.25 M Tris, 0.19 M glycine and  
235 20 % MeOH) and then in 2 N HCl. Samples were derivatized by incubating the membrane in a  
236 solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 100 mg/mL) in 2 N HCl for exactly 5 min. Sequentially,  
237 the membrane was washed for 5 min twice in 100 % MeOH, twice in Transfer Buffer and then twice  
238 in TBS-T. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody (diluted 1/25000  
239 for DNP and 1/10000 for β-actin) and washed and further probed with horseradish peroxidase (HRP)-  
240 conjugated immunoglobulin for 1 h at room temperature. Antibody binding was visualized by  
241 chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Densitometry was performed in a  
242 LAS-3000 Luminiscent Image Analyzer with the Multi Gauge software (Fujifilm Corporation, Tokyo,  
243 Japan). Standardization was performed against β-actin densitometry to correct for the protein  
244 content of the samples. Samples were assayed by duplicate in two different membranes.

245

## 246 **BDNF determination in the HC**

247 HC extracts were diluted 1:5 with DPBS (2.68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM  
248 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O and 0.49 mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O) and analyzed by ELISA according to the  
249 manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI). BDNF concentrations were interpolated from  
250 the standard curve (pg/mL) and calculated as pg of BDNF/mg of protein.

251

## 252 **Statistical analysis**

253 All statistical analysis were performed in SPSS 22.0 software (IBM, Chicago, IL, USA). The significance  
254 level was established at  $P < 0.05$  and a tendency was considered at  $0.05 \leq P \leq 0.1$ . Descriptive data  
255 are presented with the means and the standard error (mean ± SE).

## 256 **Univariate analysis**

257 Whenever possible, data were log transformed to correct the distribution and hence permit use of  
258 parametric statistics. Normality test of data and residuals was performed for each measure. Normally  
259 distributed measures were analyzed using the UNIANOVA procedure of SPSS with Tukey adjustment.  
260 HVA in the PFC did not show normal distribution and no parametric GENLIN procedure was  
261 performed. In all models, each pig was introduced as the experimental unit, the fixed effects included  
262 were transport (short (ST) and long (LT), housing conditions (outdoor (OD) and indoor (ID)) and their  
263 interaction), and pairwise comparison with Bonferroni adjustment was performed.  
264 Correlations between variables were analysed with Pearson procedure for normal distributed  
265 variables and Spearman procedure for HVA in the PFC. Network visualization of the correlations  
266 among all the variables was performed using the R statistical programming language.

267

## 268 **Data preprocessing and multivariate analysis**

269 NA in the PFC had > 20 % of missing data and was therefore removed from further analysis. For the  
270 other variables, all missing data including removed outliers and missing samples were imputed using  
271 the SPSS multiple imputation package.

272 Differences between ODLT, IDLT, ODST and IDST pigs were investigated applying the multivariate  
273 approach Fisher Discriminant Analysis. Initially, 23 variables (serum Pig-MAP, Hp, CK, NA, A and  
274 cortisol; saliva cortisol; HC c-Fos, ERK1/2, BDNF, PC, NA, DA, total DA-system, 5-HT and total 5-HT-  
275 system; PFC c-Fos, ERK1/2, PC, DA, total DA-system, 5-HT, total 5-HT-system) were included in the  
276 Discriminant Analysis model, and then, the stepwise method selected the discriminant variables on  
277 basis of Wilks' lambda statistic. The F value was set at Fentry = 3.84 and Fremoval = 2.71. Only  
278 functions with eigenvalues > 1 were selected. Internal cross-validation using leave-one-out method  
279 was performed to measure the robustness and accuracy of the discriminant analysis. A discriminant  
280 score was assigned to each subject for each discriminant function.

281

282

## 283 **Results**

284

### 285 **Serum and saliva biochemistry and serum catecholamines**

286 Numerical values are presented in Table 1 and significant differences shown in Fig 2. There was an  
287 effect of housing for the acute phase protein Hp (higher in ID pigs,  $P = 0.003$ ). The same tendency  
288 was observed for another acute phase protein, Pig-MAP ( $P = 0.066$ ). In this case there was also an  
289 effect of transport ( $P = 0.006$ ) and an interaction of both factors ( $P = 0.035$ ). Bonferroni test showed  
290 that the Pig-MAP level was significantly higher in IDST pigs than in IDLT pigs ( $P = 0.001$ ) and ODST pigs  
291 ( $P = 0.007$ ). CK, a widely used marker for skeletal muscle damage, was increased by LT ( $P < 0.001$ ),  
292 whereas no effect of housing nor interaction between both factors was observed. Cortisol in serum  
293 and saliva did not show differences by any of the factors.

294 Neither housing conditions nor transport to slaughterhouse had any effect on serum NA and A levels.

295 An interaction of transport and housing was observed for NA serum concentration ( $P < 0.001$ ).

296 Bonferroni test showed higher levels of NA in ODLT and IDST pigs than in IDLT ( $P = 0.002$  and  $P =$   
297  $0.018$ , respectively) and ODST ( $P < 0.001$  and  $P = 0.001$ , respectively) pigs.

298

299 **Table 1. Serum CK, Hp, Pig-MAP, catecholamines (NA and A) and cortisol (serum and saliva) in pigs**  
300 **raised indoors (ID) or partially outdoors (OD) and submitted to short (ST) or long (LT) road**

301 **transport.** Data are presented as means and SE.  $P$  values from univariate statistical analysis including

302 Housing, Transport and their interaction Housing\*Transport (H\*T) are shown. Statistical significant  $P$

303 values are in bold. Bonferroni test represent pair-wise comparisons: a= IDST vs IDLT, b = ODST vs

304 IDST, c = ODLT vs IDLT, d = ODST vs ODLT.

305

Sample	Parameter	Housing Condition	Transport				Statistics (P values)			
			ST		LT		Housing	Transport	H*T	Bonferroni test
			Mean	SE	Mean	SE				
Serum	CK (U/mL)	ID	1.97	0.20	7.78	2.04	0.096	<b>&lt;0.001</b>	0.940	a: <b>&lt;0.001</b>
		OD	2.37	0.38	12.08	1.74				d: <b>&lt;0.001</b>
	Hp (mg/mL)	ID	0.40	0.07	0.34	0.03	<b>0.003</b>	0.149	0.703	a: 0.440
		OD	0.23	0.07	0.13	0.04				d: <b>0.014</b>
	Pig-MAP (mg/mL)	ID	0.93	0.06	0.63	0.04	0.066	<b>0.006</b>	<b>0.035</b>	a: <b>0.001</b>
		OD	0.69	0.08	0.65	0.04				d: 0.576
	NA (ng/mL)	ID	472.36	32.21	347.03	28.48	0.863	0.149	<b>&lt;0.001</b>	a: <b>0.018</b>
		OD	289.88	48.00	517.64	25.61				d: <b>&lt;0.001</b>
	A (ng/mL)	ID	131.77	17.21	124.57	22.11	0.377	0.394	0.227	a: 0.788
		OD	90.56	26.14	131.13	9.30				d: 0.160
	Cortisol (ng/mL)	ID	43.70	2.67	34.43	5.35	0.901	0.702	0.234	a: 0.277
		OD	35.94	7.15	40.75	5.85				d: 0.550
Saliva	Cortisol (ng/mL)	ID	7.34	1.41	4.99	0.63	0.347	0.656	0.073	a: 0.105
		OD	4.47	0.93	5.92	0.78				d: 0.330

306

307

308 **Fig 2. Serum CK, Hp, Pig-MAP and NA concentration in pigs raised indoors (ID) or outdoors (OD)**

309 **and transported to the slaughterhouse in a 5 min drive (ST) or in a 2 hours drive (LT). Data is shown**

310 **as mean ± SE.**

311

## 312 **Brain monoamine NT profiles in PFC and HC**

313 The concentrations of brain monoamines and their metabolites in PFC and HC are presented in Table

314 2 and significant differences are represented in Fig 3.

315 **Table 2. Monoamine neurotransmitter profile in PFC and HC in pigs raised indoors (ID) or partially**

316 **outdoors (OD) and submitted to short (ST) or long (LT) road transport. DA and 5-HT systems**

317 represent the sum of total metabolites in each pathway (DA, DOPAC and HVA; and 5-HT and 5-HIAA,  
 318 respectively). Data are presented as means and SE. *P* values from univariate statistical analysis  
 319 including Housing, Transport and their interaction Housing\*Transport (H\*T) is shown. Statistical  
 320 significant *P* values are in bold. Bonferroni test represent pair-wise comparisons: a= IDST vs IDLT, b =  
 321 ODST vs IDST, c = ODLT vs IDLT, d = ODST vs ODLT. ND: not detectable.

Sample	Parameter (ng/mg of tissue)	Housing Condition	Transport				Statistics ( <i>P</i> values)			
			<i>ST</i>		<i>LT</i>		<i>Housing</i>	<i>Transport</i>	<i>H*T</i>	Bonferroni test
			Mean	SE	Mean	SE				
PFC	NA	<i>ID</i>	97.92	11.12	196.73	20.67	0.770	<b>&lt;0.001</b>	0.551	a: <b>&lt;0.001</b>
		<i>OD</i>	112.83	27.95	191.60	5.60				b: 0.530
	DA	<i>ID</i>	65.74	10.35	173.64	40.36	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.830	a: <b>0.014</b>
		<i>OD</i>	165.72	28.65	413.17	82.06				b: <b>0.011</b>
	DOPAC	<i>ID</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	a: -
		<i>OD</i>	ND	ND	ND	ND				b: -
	HVA	<i>ID</i>	20.55	11.95	59.50	26.68	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.414	c: -
		<i>OD</i>	45.14	21.15	241.42	88.41				d: -
	DA-system	<i>ID</i>	75.29	10.81	233.13	40.38	<b>0.000</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.727	a: 0.700
		<i>OD</i>	210.82	47.27	654.58	64.92				b: 1.000
	5-HT	<i>ID</i>	167.64	18.01	140.47	17.84	0.576	<b>0.046</b>	0.757	c: <b>0.028</b>
		<i>OD</i>	163.85	10.71	127.36	12.23				d: <b>0.010</b>
	5-HIAA	<i>ID</i>	79.36	5.77	70.28	5.17	<b>0.002</b>	0.571	0.389	a: 0.222
		<i>OD</i>	96.03	7.20	97.93	6.11				b: 0.855
	5-HT-system	<i>ID</i>	246.99	23.30	210.75	21.43	0.494	0.087	0.967	c: 0.550
		<i>OD</i>	259.87	17.24	225.29	15.84				d: 0.091
HC	NA	<i>ID</i>	256.96	30.01	296.60	56.87	0.818	0.133	0.576	a: 0.326
		<i>OD</i>	243.60	31.32	328.44	34.48				b: 0.067
	DA	<i>ID</i>	110.32	13.99	172.02	51.33	0.482	<b>0.005</b>	<b>0.043</b>	c: <b>0.006</b>
		<i>OD</i>	85.36	15.27	250.37	21.49				d: 0.827
	DOPAC	<i>ID</i>	52.53	2.80	60.68	5.05	0.978	<b>&lt;0.001</b>	0.065	a: 0.218
		<i>OD</i>								b: 0.640
									c: 0.615	

	<i>OD</i>	45.80	2.57	67.22	1.59				b: 0.167 c: 0.199 d: <b>&lt;0.001</b>
<b>HVA</b>	<i>ID</i>	397.66	26.75	553.35	49.89				a: <b>0.007</b> b: 0.786 c: 0.301 d: <b>&lt;0.001</b>
	<i>OD</i>	383.56	28.49	607.88	35.39	0.584	<b>&lt;0.001</b>	0.356	b: 0.786 c: 0.301 d: <b>&lt;0.001</b>
<b>DA-system</b>	<i>ID</i>	560.50	33.80	709.84	50.88				a: <b>0.026</b> b: 0.446 c: <b>0.002</b> d: <b>&lt;0.001</b>
	<i>OD</i>	514.72	36.76	928.75	48.69	0.057	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.006</b>	b: 0.446 c: <b>0.002</b> d: <b>&lt;0.001</b>
<b>5-HT</b>	<i>ID</i>	208.81	5.30	234.88	14.40				a: 0.215 b: 0.176 c: <b>0.029</b> d: <b>0.025</b>
	<i>OD</i>	238.71	11.12	188.90	19.14	0.582	0.419	<b>0.017</b>	a: 0.102 b: 0.093 c: 0.177 d: 0.051
<b>5-HIAA</b>	<i>ID</i>	52.56	3.86	62.42	4.00				a: 0.115 b: 0.389 c: <b>0.022</b> d: 0.114
	<i>OD</i>	42.43	2.73	54.38	5.25	<b>0.037</b>	<b>0.014</b>	0.799	a: 0.115 b: 0.389 c: <b>0.022</b> d: 0.114
<b>5-HT-system</b>	<i>ID</i>	259.93	5.71	297.31	16.45				a: 0.115 b: 0.389 c: <b>0.022</b> d: 0.114
	<i>OD</i>	280.78	10.40	243.28	21.70	0.313	0.997	<b>0.031</b>	a: 0.115 b: 0.389 c: <b>0.022</b> d: 0.114

322

323 **Fig 3. Monoamine neurotransmitter profile in pigs raised indoors (ID) or outdoors (OD) and**  
324 **transported to the slaughterhouse in a 5 min drive (ST) or in a 2 hours drive (LT) in the PFC (A) and**  
325 **HC (B).** DA and 5-HT -systems represent the sum of total metabolites in each pathway (DA, DOPAC  
326 and HVA, and 5-HT and 5-HIAA, respectively). Only significant differences are included. Data is shown  
327 as mean ± SE.

328

329 In the PFC, living indoors or partially outdoors does have a significant effect on DA and HVA  
330 concentration, being higher in OD animals ( $P = 0.001$  and  $P = 0.004$ , respectively), leading to an  
331 increase in total DA-system ( $P < 0.001$ ). Levels of 5-HIAA are also affected by housing conditions ( $P =$   
332  $0.002$ ), showing OD animals higher levels of the 5-HT catabolite.

333 The PFC was extremely sensitive to long transport, being the NA, the DA and the 5-HT pathways  
334 altered. The PFC showed an elevated catecholamine pathway with higher concentration of NA ( $P <$   
335  $0.001$ ), and DA ( $P = 0.001$ ) and HVA ( $P < 0.001$ ) with a concomitant important increase in DA-system  
336 in LT pigs ( $P < 0.001$ ). In contrast, the concentration of 5-HT decreased slightly ( $P = 0.046$ ).

337 In the HC, DA and its metabolites DOPAC and HVA were increased in LT group ( $P < 0.001$  for DOPAC  
 338 and HVA, and  $P = 0.005$  for DA), and as a consequence total DA-system was increased as well ( $P <$   
 339  $0.001$ ). An interaction between both factors was observed for DA ( $P = 0.043$ ). Bonferroni test  
 340 revealed DA significantly increased in ODLT compared to ODST ( $P = 0.001$ ) and showed a tendency  
 341 when compared to IDLT ( $P = 0.056$ ). For indoleamines, a slight decrease in 5-HIAA concentration is  
 342 observed in OD pigs versus ID pigs ( $P=0.037$ ). A slight increase in 5-HIAA was observed in LT group  
 343 compared to ST group ( $P=0.014$ ). There was an interaction effect of housing conditions and road  
 344 transport for 5-HT and total indoleamines ( $P = 0.017$ ). Bonferroni test showed that there was a  
 345 reduction of 5-HT and total indoleamines in ODLT pigs compared to IDLT pigs ( $P = 0.029$  and  $P =$   
 346  $0.022$  respectively) and compared to ODST ( $P = 0.025$  only for 5-HT).

347

### 348 **Molecular markers of stress in PFC and HC: c-Fos, ERK1/2 and** 349 **protein carbonylation (PC)**

350 The abundance of protein corresponding to two well-established stress markers in brain was  
 351 analyzed in HC and PFC by western blot (Table 3 and Fig 4).

352

353 **Table 3. Brain molecular and oxidative stress markers in PFC and HC in pigs raised indoors (ID) or**  
 354 **partially outdoors (OD) and submitted to short (ST) or long (LT) road transport.** Data are presented  
 355 as means and SE.  $P$  values from univariate statistical analysis including Housing, Transport and their  
 356 interaction Housing\*Transport ( $H^*T$ ) are shown. Statistical significant  $P$  values are in bold. Bonferroni  
 357 test represent pair-wise comparisons: a= IDST vs IDLT, b = ODST vs IDST, c = ODLT vs IDLT, d = ODST  
 358 vs ODLT. PC: Protein Carbonylation.

359

Sample	Parameter	Housing Condition	Transport				Statistics ( $P$ values)			
			ST		LT		Housing	Transport	$H^*T$	Bonferroni test
			Mean	SE	Mean	SE				
<hr/>										

PFC	PC	ID	0.845	0.093	0.595	0.072	0.135	0.076	0.353	a: 0.060
		OD	0.623	0.087	0.541	0.098				b: 0.106
	c-Fos	ID	0.749	0.206	0.764	0.124	0.257	0.887	0.942	a: 0.961
		OD	0.987	0.279	1.034	0.151				b: 0.447
	ERK1/2	ID	0.563	0.150	0.582	0.194	0.693	0.400	0.458	a: 0.944
		OD	0.498	0.076	0.794	0.215				b: 0.817
HC	PC	ID	1.527	0.750	1.352	0.125	<b>0.001</b>	<b>0.025</b>	0.097	a: 0.630
		OD	2.943	0.299	1.886	0.348				b: <b>0.001</b>
	c-Fos	ID	1.147	0.113	1.344	0.098	0.351	<b>0.036</b>	0.424	a: 0.316
		OD	0.907	0.143	1.325	0.173				b: 0.226
	ERK1/2	ID	1.154	0.157	1.52	0.172	0.933	0.055	0.842	a: 0.210
		OD	1.097	0.169	1.543	0.276				c: 0.923
									d: <b>0.043</b>	

360

361 **Fig 4. Molecular markers in the HC of pigs raised indoors (ID) or outdoors (OD) and transported to**  
362 **the slaughterhouse in a 5 min drive (ST) or in a 2 hours drive (LT).** (A) Representative Western blot  
363 of c-Fos and ERK1/2 and densitometry of all individual samples (n=24). A sample brain was used as  
364 internal control (C) to allow inter-gel comparison. Actin was used as loading control. Results are  
365 presented as ratios of absorbance units (AU) of protein band to AU of  $\beta$ -actin. (B) Protein  
366 carbonylation (PC) represented as AU of DNP groups to AU of  $\beta$ -actin ratio. Data is shown as mean  $\pm$   
367 SE.

368

369 In the PFC, there was no difference neither in c-Fos nor ERK1/2 due to housing conditions or road  
370 transport. In the HC, the level of c-Fos and ERK1/2 was similar in animals in both housing conditions  
371 (ID, OD). Nevertheless, an increase in the intensity of the band corresponding to these proteins was  
372 observed after a long road transport for both proteins (Fig 4A). Statistical analysis showed an effect  
373 of transport for c-Fos ( $P = 0.036$ ) and a tendency for ERK1/2 ( $P = 0.055$ ), with no interaction between  
374 both factors.



375 The degree of PC was determined as a marker of oxidative stress by slot blot (Table 3). In the PFC,  
 376 there was no housing effect, but a tendency was observed for transport ( $P = 0.076$ ) being lower in LT  
 377 pigs. In the HC, the level of carbonyl groups was affected by housing conditions (lower levels in ID  
 378 pigs,  $P = 0.001$ ) and transport (lower in LT pigs,  $P = 0.025$ ) (Fig 4B).

379

## 380 Hippocampal BDNF

381 BDNF was measured in the HC (Table 4). As shown in Fig 5, a decrease in the neurotrophic factor  
 382 concentration was observed in LT animals ( $P = 0.012$ ). No effect of housing and no interaction  
 383 between both factors were shown.

384

385 **Table 4. BDNF in HC in pigs raised indoors (ID) or partially outdoors (OD) and submitted to short**  
 386 **(ST) or long (LT) road transport.** Data are presented as means and SE.  $P$  values from univariate  
 387 statistical analysis including Housing, Transport and their interaction Housing\*Transport (H\*T) are  
 388 shown. Statistical significant  $P$  values are in bold. Bonferroni test represent pair-wise comparisons: a=  
 389 IDST vs IDLT, b = ODST vs IDST, c = ODLT vs IDLT, d = ODST vs ODLT.

Parameter	Housing Condition	Transport				Statistics ( $P$ values)			
		ST		LT		Housing	Transport	H*T	Bonferroni test
		Mean	SE	Mean	SE				
HC BDNF (pg/mg protein)	ID	22.53	1.842	17.312	2.358	0.804	<b>0.012</b>	0.397	a: 0.201
	OD	24.202	3.737	14.27	2.236				b: 0.676
									c: 0.428
									d: <b>0.016</b>

390

391

392 **Fig 5. BDNF concentration in the HC of pigs raised indoors (ID) or outdoors (OD) and transported to**  
 393 **the slaughterhouse in a 5 min drive (ST) or in a 2 hours drive (LT).** Data is presented as mean of  
 394 pg/mg of protein  $\pm$  SE.

395

396 **Multivariate analysis**

397 Stepwise discriminant analysis of 23 variables of HC, PFC and serum samples selected 4 variables and  
 398 3 discriminant functions that were significantly associated with housing\*transport treatments: DA-  
 399 system in the PFC, NA in serum, PC in HC and 5-HT in HC. The discriminant analysis showed that  
 400 Wilk’s Lambda, as a test of the discriminant functions, were significant (Function 1: lambda = 0.021, *P*  
 401 < 0.001; Function 2: lambda = 0.178, *P* < 0.001; Function 3: lambda = 0.639, *P* = 0.014), but only  
 402 Discriminant functions 1 (DF1) and 2 (DF2) had eigenvalues > 1 and were included in the posterior  
 403 analysis. Coefficients of the selected variables on the discriminant functions are show in Table 5. The  
 404 self-verification using internal cross-variation (leaving-one-out method) revealed high accuracy (83.3  
 405 %) with only 4 variables (Table 6). DF1 clearly discriminated ODLT pigs from the other groups. DF2  
 406 was able to discriminate IDST and ODST groups, the two groups with higher intra-group variability.  
 407 There was low overlapping of confident ellipse of IDLT-group with ODST and IDST groups, as also  
 408 showed in the internal cross-validation that classified correctly all the individuals, except for one IDST  
 409 and two ODST pigs that were included in IDLT group, and one IDLT that was included in IDST group  
 410 (Fig 6).

411 **Table 5. Wilks Lambda, Eigenvalues, cumulative proportions and standardized canonical**  
 412 **discriminant function coefficients of the discriminant analysis.**

	<b>DF1</b>	<b>DF2</b>
Wilks' Lambda	0.021	0.178
Significance	< 0.001	< 0.001
Eigenvalue	7.604	2.586
Cumulative proportion	70.7	94.7
<b>Variables</b>		
PC (HC)	-0.273	0.702
NA (serum)	0.671	-0.641
DA-system (PFC)	0.975	0.413
5-HT (HC)	-0.677	0.357

413

414 **Table 6. Classification results of self-verification of the discriminant analysis.**

Actual classification	Predicted group membership			
	IDST (%)	IDLT (%)	ODST (%)	ODLT (%)
IDST	5 (83.3)	1 (16.7)	0	0
IDLT	1 (16.7)	5 (83.3)	0	0
ODST	0	2 (33.3)	4 (66.7)	0
ODLT	0	0	0	6 (100)

There were 21 individuals correctly classified (83.3%)

415

416 **Fig 6. Score plot from a discriminant analysis.** Each subject is represented according the score  
417 obtained for discriminant functions 1 and 2. The colour of these points and of the grouped oval  
418 indicates the experimental groups (IDST, IDLT, ODST and ODLT).

419

## 420 Correlation between all parameters

421 Network visualization of the correlations among all the variables is represented in Fig 7 and complete  
422 data is presented as S1 Table. In all cases, metabolites in the same pathway were highly correlated in  
423 each region (i.e. DA, DOPAC, HVA; 5-HT, 5-HIAA). In consequence and for simplicity, “DA-system” and  
424 “5-HT-system” terms are used to refer to any of the metabolites in those pathways.

425

426 **Fig 7. Graphical representation of correlations between parameters.** Circle nodes represent NT  
427 parameters, square nodes represent molecular and oxidative stress markers and rectangle nodes  
428 represent general biochemistry parameters. The colour of nodes indicates the sample of origin (red:  
429 PFC; blue: HC; green: serum and purple: saliva). The size of nodes is proportional to the sum of the  
430 correlations (in absolute value) of that parameter with all others. Positively correlated parameters  
431 are connected with a green line and negatively correlated parameters are connected with a red line.  
432 Statistical significance correlations ( $R > 0.4$  and  $P < 0.05$ ) are represented by thick lines, whereas  
433 correlations with  $R < 0.4$  and  $P > 0.05$  are represented by transparent lines.

434

435 **Positive correlations:** The DA-system is correlated with the NA-system in the PFC and in the HC. Both  
436 systems are also correlated between areas (DA-system in PFC vs HC, and NA-system in PFC vs HC).

437 The DA-system in the HC is also correlated to the NA-system in the PFC. Both the DA and NA -systems  
438 in the HC are also correlated to serum catecholamine concentration. c-Fos is correlated to ERK1/2  
439 and DA-system in the HC. Serum CK is correlated to the DA and NA -systems in the PFC and to the  
440 DA-system and c-Fos in the HC. PC is correlated to 5-HT-system in the PFC.

441 **Negative correlations:** BDNF is correlated to the NA and DA-systems, c-Fos and ERK1/2 in the HC and  
442 with NA-system in the PFC. The NA and DA -systems are correlated to PC in the PFC, and to serum  
443 acute phase proteins (Hp and Pig-MAP). Serum CK is correlated to BDNF in the HC, to PC in the PFC  
444 and to serum acute phase proteins. 5-HT-system in the HC is correlated to ERK1/2 and PC in the HC  
445 and to serum and saliva cortisol ( $P = 0.076$  for saliva cortisol). c-Fos in the PFC is correlated to c-Fos  
446 and ERK1/2 in the HC.

447

## 448 **Discussion**

449

450 The main objective of the present work was to assess the molecular changes in the HC and the PFC  
451 combining two factors: housing conditions and road transport. In this experiment animals housed  
452 indoors (ID), which is the normal condition in intensive production systems, were compared to  
453 animals spending 4 hours per day outdoors (OD) in a large space during the last month before  
454 slaughter. Animals from both groups were then subjected to both types of road transport: short  
455 transport (ST) consisted in 5 min quiet drive whereas long transport (LT) was 2 hours in a truck  
456 driving by uncomfortable roads. Results are summarized in Fig 8. It has to be taken into account that  
457 the present experiment has been carried out in female pigs, and that several authors have reported  
458 gender-dependent effects in environmental enrichment studies in rodents [25,47,48]. Thus, further  
459 research is needed to test whether there are sex differences in the animal's response in the porcine  
460 specie.

461

462 **Fig 8. Schematic representation of the significant changes in NTs, molecular biomarkers and serum**  
463 **parameters provoked by living style and road transport.** Square nodes are originating tissues and  
464 circle nodes are featured parameters. Size of circle nodes indicates size of ratios between housing  
465 groups or transport groups (ratios were always calculated between higher and lower numerical  
466 values). Orange nodes represent parameters lower in OD versus ID pigs or in LT versus ST pigs. Green  
467 nodes represent parameters higher in OD versus ID pigs or in LT versus ST pigs. Featured parameters  
468 are connected to originating tissues with a grey line. Continuous line represents significant effects of  
469 housing or road transport. Discontinuous line represents significant interaction between both  
470 factors.

471

472 Outdoors systems have been claimed to provide the animals with an EE [2,3]. Our results indicate  
473 that pigs raised in this environment four hours per day had lower levels of the acute phase proteins  
474 Hp and Pig-MAP. These proteins are well-accepted markers for infection or inflammation, but they  
475 are also considered indicators of stress [49–52], probably indicating that outdoors rearing  
476 contributes to a better degree of welfare. Serum and saliva cortisol were not altered but blood  
477 samples were taken at slaughter, thus the acute stress due to this procedure should be similar for all  
478 the individuals.

479 In the CNS, the main pathway reacting to housing conditions was the DA system in the PFC, showing  
480 an important activation indicated by an increase in DA, HVA and total DA-system. DA is known for its  
481 main role in reward seeking behaviour and low levels of DA are associated to impulsive behaviours,  
482 since DA in the brain is linked to feelings of pleasure and general well-being [53,54]. A higher  
483 dopaminergic neurotransmission in the PFC has been described in rats subjected to EE [28]. In  
484 contrast, even though the role of 5-HT in stress and welfare is acknowledged [55], this pathway is  
485 slightly affected in the present study. 5-HIAA, the metabolite of 5-HT, is slightly but significantly  
486 increased in the PFC and slightly decreased in the HC in pigs raised outdoors. This situation may be  
487 similar to that described in rats, where EE conditions reduce the concentration of 5-HT in the HC [30].

488 Altogether, our results suggest that having outdoors access, even only four hours per day, increases  
489 the well-being of the pigs. There were no changes associated to housing neither in molecular stress  
490 markers as c-Fos or ERK1/2 in any of the brain areas. It has been reported that EE enhances the levels  
491 of BDNF in the HC [25,31,32], but living indoors or having partial outdoors access does not modify  
492 the levels of this factor in the present study. Nevertheless, an increase in PC in the HC was observed,  
493 but not in the PFC. PC is widely used as an index of the molecular consequences of oxidative stress,  
494 which may lead to deleterious consequences in many biological systems and organs. The higher  
495 oxidation level in the HC in animals living outdoors may be consequence of an effect of sunlight [56],  
496 probably through an indirect mechanism.

497

498 Long road transport affected many aspects of the pigs' biology. In serum, a large increase in CK  
499 concentration was observed, indicating the existence of muscular damage probably associated to a  
500 higher proportion of injuries in a 2-hour transport compared to a 5-min drive. Interestingly, there  
501 was an interaction between housing and transport in serum NA concentration, a marker of acute  
502 stress, suggesting that animals living outdoors were more sensible to long road transport than  
503 animals living indoors.

504 The DA pathway is largely affected by long road transport. In comparison to short transport, DA, HVA  
505 and DOPAC are increased in the HC and DA and HVA in the PFC. Although, as stated above, DA has  
506 been mainly associated to reward pathways, neurochemical studies have demonstrated that the DA  
507 system is activated also by stressful stimuli [57]. This stress-induced hyperdopaminergic state is  
508 driven by the HC (specifically at the ventral subiculum region, vSub, the primary output of the area)  
509 in a way that, if a threat or specific situation requiring high vigilance is present, the HC will set the DA  
510 system to a higher level of activity, rendering it more reactive to deliver the appropriate response or  
511 facilitating escape [58]. The mechanism may be driven by glucocorticoids (GC) since HC neurons  
512 express GC receptors, may be damaged by stress and have been related to the plasticity of the brain  
513 to adapt to stress [59]. The evolutive meaning is stress being helpful for memory consolidation,

514 which is mediated by the HC [60]. Memories are then transferred to the cortex, important for the  
515 executive, cognitive and emotional control of behaviour [12]. Indeed, our results show that the DA  
516 pathway is also activated in the PFC after long transport. Likewise, changes in DA in the PFC during  
517 stress have been associated to a state of vigilance, leading to a better control of locomotion and  
518 increasing neuronal information processing [61]. In laboratory animals, exposure to a variety of  
519 stressors results in an increase of DA as measured by postmortem neurochemistry [62]. This  
520 coincidence of DA being associated to well-being as well as stressful situations is probably linked to  
521 the highly polemic discussion about DA's role in pleasure and pain [63].

522 An increase in NA is observed in the PFC after long road transport. The PFC is a crucial component in  
523 the responses to stressful stimuli and it has been suggested that it is selectively activated by social or  
524 psychological stressors [58], which should be the case in pigs transported in a truck. Previous studies  
525 in laboratory animals have shown that both NA turnover and release increase with stress in brain  
526 regions mediating stress responses such as the cortex [64], similar to the situation observed in the  
527 present study in long road transport. This noradrenergic signalling has been linked to the HPA axis  
528 responses [64].

529 Regarding the serotonergic system, long road transport decreases 5-HT in the PFC and increases 5-  
530 HIAA in the HC but these effects are mild.

531 Exposure to long transport induced higher levels of c-Fos expression and a tendency for ERK1/2 in  
532 the HC. It is generally accepted that c-Fos induction reflects the functional activity of neurons in  
533 stress-related neuronal circuitries [21,65,66]. For example, *c-FOS* mRNA concentration was increased  
534 in piglets born from sows subjected to reallocation during late pregnancy, indicating a greater  
535 neuronal activation of the HC and increased perception of a stressful situation [38]. It is well-known  
536 that induction of c-Fos occurs in a wide range of brain structures after exposure of experimental  
537 animals to various acute stressors, including the PFC and the HC [22,67]. In our case, activation of  
538 these pathways occurs after road transport for 2h, in agreement with the reports about c-Fos  
539 expression occurring rapidly, usually within a few minutes with maximal levels at 60–90 min after the

540 stressor [14]. Accordingly with this mechanism, c-Fos and ERK1/2 appear to be highly correlated in  
541 the HC ( $R = 0.629$ ,  $P = 0.002$ ). c-Fos is also correlated to the HC DA-system ( $R = 0.503$  and  $P = 0.020$ )  
542 and NA in the PFC ( $R = 0.541$  and  $P = 0.030$ ). Globally, there is a positive correlation between the DA  
543 and NA systems in both brain areas, and also to serum catecholamines, thus indicating an induction  
544 of these mechanisms during stress, as already reported [68,69]. Interestingly, serum CK is highly  
545 correlated to these NT systems, linking physical damage to stress-associated neurochemical  
546 pathways.

547 BDNF is a neurotrophin that plays an important role in synaptic plasticity, neuronal survival,  
548 neurogenesis and neuronal activity [57,70]. Indeed, many different types of acute and chronic  
549 stressors decrease BDNF expression in the HC [19,33] and low hippocampal BDNF expression is  
550 consistently associated with depressive-like behaviour [20,57]. In our study, hippocampal BDNF is  
551 decreased to a 60 % after long road transport in pigs, suggesting that this decrease may be one cause  
552 of the negative consequences of road transport stress. Furthermore, BDNF is negatively correlated to  
553 stress-linked brain NT pathways and also to serum CK.

554 The multivariate discriminant analysis gave interesting conclusions. Animals raised outdoors and  
555 submitted to a long transport (Fig 6, ODLT group, violet oval) were clearly differentiated from the  
556 other groups in an analysis that was based in a combination of DA-system in the PFC, 5-HT in the HC,  
557 NA in the serum and PC in the HC. The inclusion of other parameters does not improve the  
558 discrimination ability of the test. Animals living indoors and outdoors subjected to a short transport  
559 (IDST and ODST groups, blue and red oval, respectively) were also clearly discriminated, indicating  
560 that even a relatively short time in the open air clearly has an effect on the physiology of these  
561 animals.

562 In conclusion, our work showed that housing conditions and road transport modify the  
563 neurophysiology of pigs, shedding some light about the molecular mechanisms underlying these  
564 changes. Altogether, our results indicate that the animals raised partially outdoors are more affected  
565 by long transport than animals raised indoors, suggesting that they cope differently with unknown



566 environments. A plausible explanation would be that those animals, living in a more natural  
567 environment and being more able to express species-specific behaviours, remain more alert to  
568 external stimuli and thus they may be more sensible to novel challenges.

569

## 570 **Acknowledgements**

571

572 We are grateful to Dr Mercedes Unzeta and Susana Benitez (Departament de Bioquímica i Biologia  
573 Molecular, Facultat de Medicina, UAB) for their help with the HPLC analysis; Mr Borja Andrino for his  
574 help in implementation of computer codes for data visualization, and Anna Vilalta for her excellent  
575 technical assistance.

## 576 **References**

577

- 578 1. Tozawa A, Tanaka S, Sato S. The Effects of Components of Grazing System on Welfare of  
579 Fattening Pigs. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2016;29: 428–435.
- 580 2. Millet S, Moons CP, Van Oeckel MJ, Janssens GP. Welfare, performance and meat quality of  
581 fattening pigs in alternative housing and management systems: a review. *J Sci Food Agric.*  
582 2005;85: 709–719. doi:10.1002/jsfa.2033
- 583 3. Honeyman MS. Extensive bedded indoor and outdoor pig production systems in USA: current  
584 trends and effects on animal care and product quality. *Livest Prod Sci.* 2005;94: 15–24.  
585 doi:10.1016/j.livprodsci.2004.11.029
- 586 4. Terlouw C, Berne A, Astruc T. Effect of rearing and slaughter conditions on behaviour ,  
587 physiology and meat quality of Large White and Duroc-sired pigs. *Livest Sci.* 2009;122: 199–  
588 213. doi:10.1016/j.livsci.2008.08.016
- 589 5. Edwards SA. Product quality attributes associated with outdoor pig production. *Livest Prod*  
590 *Sci.* 2005;94: 5–14. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.11.028
- 591 6. Terlouw EMC, Arnould C, Auperin B, Berri C, Bihan-duval E Le, Deiss V, et al. Pre-slaughter  
592 conditions , animal stress and welfare : current status and possible future research. *Animal.*  
593 2008;2: 1501–1517. doi:10.1017/S1751731108002723
- 594 7. Lebret B, Ecolan P, Bonhomme N, Méteau K, Prunier A. Influence of production system in local  
595 and conventional pig breeds on stress indicators at slaughter , muscle and meat traits and  
596 pork eating quality. *Animal.* 2015;9: 1404–1413. doi:10.1017/S1751731115000609
- 597 8. Klont RE, Hulsegge B, Gerritzen MA, Kurt E, Jong IC De, Kranen RW. Relationships between  
598 behavioral and meat quality characteristics of pigs raised under barren and enriched housing  
599 conditions 1. *J Anim Sci.* 1999;79: 2835–2843.
- 600 9. Warriss PD, Kestin SC, Robinson JM. A note on the influence of rearing environment on meat

- 601 quality in pigs. *Meat Sci.* 1983;9: 271–279. doi:10.1016/0309-1740(83)90037-2
- 602 10. Nilzén V, Babol J, Dutta PC, Lundeheim N, Enfält AC, Lundström K. Free range rearing of pigs  
603 with access to pasture grazing - effect on fatty acid composition and lipid oxidation products.  
604 *Meat Sci.* 2001;58: 267–275. doi:10.1016/S0309-1740(00)00164-9
- 605 11. Enfält A-C, Lundström K, Hansson I. Effects of Outdoor Rearing and Sire Breed (Duroc or  
606 Yorkshire) on Carcass Composition and Sensory and Technological Meat Quality. *Meat Sci.*  
607 1997;45: 1–15. doi:10.1016/S0309-1740(96)00101-5
- 608 12. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of neural science.  
609 5th editio. Sydor A, Lebowitz H, editors. McGraw-Hill Companies, Inc.; 2013.
- 610 13. Filipovic D, Todorovic N, Benardi RE, Grass P. Oxidative and nitrosative stress pathways in the  
611 brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like  
612 symptoms. *Brain Struct Funct.* 2017;222: 1–20. doi:10.1007/s00429-016-1218-9
- 613 14. Pacák K PM. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses : Implications for  
614 Stress-Related Disorders. *Endocr Rev.* 2001;22: 502–548.  
615 doi:http://dx.doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436
- 616 15. Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone  
617 and body-brain integration. *Brain Res.* 2012;1476: 71–85. doi:10.1016/j.brainres.2011.12.049
- 618 16. Foury A, Lebret B, Chevillon P, Vautier A, Terlouw C, Morme P. Alternative rearing systems in  
619 pigs : consequences on stress indicators at slaughter and meat quality. *Animal.* 2011;5: 1620–  
620 1625. doi:10.1017/S1751731111000784
- 621 17. Giovannini MG, Efoudebe M, Passani MB, Baldi E, Bucherelli C, Giachi F, et al. Improvement in  
622 fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci.*  
623 2003;23: 9016–9023. doi:23/27/9016 [pii]
- 624 18. Bielas H, Arck P, Bruenahl CA, Walitza S, Grünblatt E. Prenatal stress increases the striatal and  
625 hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring.  
626 *Int J Dev Neurosci.* 2014;38: 30–35. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.07.006

- 627 19. Bennett MR, Lagopoulos J. Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and  
628 regression. *Prog Neurobiol.* 2014;112: 80–99. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.10.005
- 629 20. Nikulina EM, Johnston CE, Wang J, Jr RPH. Review Neurotrophins in the Ventral Tegmental  
630 Area : Role in Social Stress , Mood Disorders and Drug Abuse. *Neuroscience.* 2014;282: 122–  
631 138. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.028
- 632 21. Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovács KJ, Sawchenko PE. A comparison of two immediate-  
633 early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related  
634 neuroendocrine circuitry. *J Neurosci.* 1993;13: 5126–38.
- 635 22. Shen C, Tsimberg Y, Salvadore C, Meller E. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute  
636 swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci.* 2004;5: 36. doi:10.1186/1471-2202-5-36
- 637 23. Şahin E, Gümüşlü S. Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: Role of stressed  
638 conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation. *Int J*  
639 *Biometeorol.* 2004;48: 165–171. doi:10.1007/s00484-004-0205-7
- 640 24. Kotloski RJ, Sutula TP. Environmental enrichment: Evidence for an unexpected therapeutic  
641 influence. *Experimental Neurology.* 2015;264: 121–126. doi:10.1016/j.expneurol.2014.11.012
- 642 25. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural  
643 and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.* 2011;222: 246–264.  
644 doi:10.1016/j.bbr.2011.04.002
- 645 26. Darna M, Beckmann JS, Gipson CD, Bardo MT, Dwoskin LP. Effect of environmental  
646 enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in  
647 medial prefrontal and orbitofrontal cortex. *Brain Res.* 2015;1599: 115–125.  
648 doi:10.1016/j.brainres.2014.12.034
- 649 27. Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment enhances sensitization to  
650 GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial  
651 prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 2004;148: 107–17.
- 652 28. Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment decreases cell

- 653 surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem.*  
654 2005;93: 1434–1443. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03130.x
- 655 29. Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, et al. Differential effects of  
656 environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical  
657 responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and  
658 emotional memories. *J Neural Transm.* 2013;120: 829–843. doi:10.1007/s00702-012-0935-3
- 659 30. Galani R, Berthel M-C, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, et al. The behavioral  
660 effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters  
661 hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem.* 2007;88: 1–10.  
662 doi:10.1016/j.nlm.2007.03.009
- 663 31. Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term  
664 environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp*  
665 *Neurol.* 2000;164: 45–52. doi:10.1006/exnr.2000.7415
- 666 32. Jain V, Baitharu I, Prasad D, Ilavazhagan G. Enriched Environment Prevents Hypobaric Hypoxia  
667 Induced Memory Impairment and Neurodegeneration: Role of BDNF/PI3K/GSK3 $\beta$  Pathway  
668 Coupled with CREB Activation. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0062235
- 669 33. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol*  
670 *Psychiatry.* 2006;59: 1116–1127. doi:10.1016/j.biopsych.2006.02.013
- 671 34. Herring A, Blome M, Ambrãe O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Reduction of cerebral  
672 oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology.  
673 *Brain Pathol.* 2010;20: 166–175. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00257.x
- 674 35. Adeola O, Ball RO, House JD, O’Brien PJ. Regional brain neurotransmitter concentrations in  
675 stress-susceptible pigs. *J Anim Sci.* 1993;71: 968–74.
- 676 36. Rosochacki SJ, Piekarzewska a. B, Poloszynowicz J, Sakowski T. Genetic differences in brain  
677 monoamines level in Pietrain and Duroc pigs exposed to acute restraint stress. *J Anim Breed*  
678 *Genet.* 2003;120: 192–209. doi:10.1046/j.1439-0388.2003.00380.x

- 679 37. Piekarczywska a B, Rosochacki SJ, Sender G. The effect of acute restraint stress on regional  
680 brain neurotransmitter levels in stress-susceptible pietrain pigs. *J Vet Med A Physiol Pathol*  
681 *Clin Med.* 2000;47: 257–269.
- 682 38. Otten W, Kanitz E, Couret D, Veissier I, Prunier A, Merlot E. Maternal social stress during late  
683 pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter  
684 systems in pig offspring. *Domest Anim Endocrinol.* 2010;38: 146–56.  
685 doi:10.1016/j.domaniend.2009.09.002
- 686 39. Poletto R, Meisel RL, Richert BT, Cheng HW, Marchant-Forde JN. Behavior and peripheral  
687 amine concentrations in relation to ractopamine feeding, sex, and social rank of finishing pigs.  
688 *J Anim Sci.* 2010;88: 1184–1194. doi:10.2527/jas.2008-1576; 10.2527/jas.2008-1576
- 689 40. Poletto R, Cheng H-W, Meisel RL, Richert BT, Marchant-Forde JN. Gene expression of  
690 serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and  
691 subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a  $\beta$ -adrenoreceptor agonist. *Brain Res.*  
692 2011;1381: 11–20. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.035
- 693 41. Valros A, Palander P, Heinonen M, Munsterhjelm C, Brunberg E, Keeling L, et al. Evidence for a  
694 link between tail biting and central monoamine metabolism in pigs (*Sus scrofa domestica*).  
695 *Physiol Behav.* 2015;143: 151–7. doi:10.1016/j.physbeh.2015.02.049
- 696 42. Poletto R, Cheng HW, Meisel RL, Garner JP, Richert BT, Marchant-Forde JN. Aggressiveness  
697 and brain amine concentration in dominant and subordinate finishing pigs fed the -  
698 adrenoreceptor agonist ractopamine. *J Anim Sci.* 2010;88: 3107–3120. doi:10.2527/jas.2009-  
699 1876
- 700 43. Arroyo L, Carreras R, Valent D, Peña R, Mainau E, Velarde A, et al. Effect of handling on  
701 neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiol Behav.*  
702 2016;167: 374–381. doi:10.1016/j.physbeh.2016.10.005
- 703 44. Sabria J, Torres D, Pasto M, Peralba JM, Allali-Hassani A, Pares X. Release of neurotransmitters  
704 from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: differential effects in cortex

- 705 and hippocampus. *Addict Biol.* 2003;8: 287–294. doi:10.1080/13556210310001602194
- 706 45. Caroldi S, Jarvis J, Magos L. Carbon disulphide exposure affects the response of rat adrenal  
707 medulla to hypothermia and hypoglycaemia. *Br J Pharmacol.* 1985;84: 357–63.
- 708 46. Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination  
709 of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem.* 1999;266: 48–57.  
710 doi:10.1006/abio.1998.2932
- 711 47. Peña Y, Prunell M, Dimitsantos V, Nadal R, Escorihuela RM. Environmental enrichment effects  
712 in social investigation in rats are gender dependent. *Behavioural Brain Research.* 2006;174:  
713 181-187. doi:10.1016/j.bbr.2006.07.007
- 714 48. Girbovan C, Plamondon H. Environmental enrichment in female rodents: Considerations in  
715 the effects on behavior and biochemical markers. *Behav Brain Res.* 2013;253: 178–190.  
716 doi:10.1016/j.bbr.2013.07.018
- 717 49. Marco-Ramell A, Pato R, Peña R, Saco Y, Manteca X, Ruiz de la Torre JL, et al. Identification of  
718 serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J.* 2011;190: e66-  
719 71. doi:10.1016/j.tvjl.2011.01.003
- 720 50. Saco Y, Docampo MJ, Fabrega E, Manteca X, Diestre A, Lampreave F, et al. Effect of stress  
721 transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Anim Welf.* 2003;12: 403–409.
- 722 51. Salamano G, Mellia E, Candiani D, Ingravalle F, Bruno R, Ru G, et al. Changes in haptoglobin, C-  
723 reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in  
724 swine. *Vet J.* 2008;177: 110–115. doi:10.1016/j.tvjl.2007.03.015
- 725 52. Pineiro M, Pineiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell FM, Eckersall PD, et al.  
726 Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J.* 2007;173:  
727 669–674. doi:10.1016/j.tvjl.2006.02.006
- 728 53. Blum K, Chen AL, Giordano J, Borsten J, Chen TJ, Hauser M, et al. The Addictive Brain: All  
729 Roads Lead to Dopamine. *J Psychoactive Drugs.* 2012;44: 134–143.  
730 doi:10.1080/02791072.2012.685407

- 731 54. Rutledge RB, Skandali N, Dayan P, Dolan RJ. Dopaminergic modulation of decision making and  
732 subjective well-being. *J Neurosci*. 2015;35: 9811–9822. doi:10.1523/JNEUROSCI.0702-15.2015
- 733 55. Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. Corticosteroid–serotonin interactions in  
734 the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32:  
735 1174–1184. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.04.006
- 736 56. Svobodová AR, Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Ulrichová J, Vostálová J. Acute exposure  
737 to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver  
738 and blood of hairless mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34: 471–9.
- 739 57. Joca SRL, Ferreira FR, Guimarães FS. Modulation of stress consequences by hippocampal  
740 monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress*. 2007;10: 227–  
741 249. doi:10.1080/10253890701223130
- 742 58. Belujon P, Grace AA. Regulation of dopamine system responsivity and its adaptive and  
743 pathological response to stress. *Proc Biol Sci*. 2015;282. doi:10.1098/rspb.2014.2516
- 744 59. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*.  
745 2000;886: 172–189.
- 746 60. Bangasser DA, Shors TJ. The hippocampus is necessary for enhancements and impairments of  
747 learning following stress. *Nat Neurosci*. 2007;10: 1401–1403. doi:10.1038/nn1973
- 748 61. Vermetten E, Bremner JD. Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depress  
749 Anxiety*. 2002;15: 126–147. doi:10.1002/da.10016
- 750 62. Pezze MA, Feldon J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol*.  
751 2004;74: 301–20. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.004
- 752 63. Leknes S, Tracey I. A common neurobiology for pain and pleasure. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:  
753 314–320. doi:10.1038/nrn2333
- 754 64. Douglas AJ. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the  
755 Hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress*.  
756 2005;8: 5–18. doi:10.1080/10253890500044380



- 757 65. Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map.  
758 Neurochem Int. 1998;33: 287–97.
- 759 66. Ons S, Marti O, Armario A. Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-  
760 regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain:  
761 relationship to c-fos mRNA. J Neurochem. 2004;89: 1111–1118. doi:10.1111/j.1471-  
762 4159.2004.02396.x
- 763 67. Reul JMHM. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene  
764 transcription, and signaling pathways. Front Psychiatry. 2014;5: 5.  
765 doi:10.3389/fpsyt.2014.00005
- 766 68. Kang DK, Kim KO, Lee SH, Lee YS, Son H. c-Fos expression by dopaminergic receptor activation  
767 in rat hippocampal neurons. Mol Cells. 2000;10: 546–51.
- 768 69. Sarinana J, Kitamura T, Kunzler P, Sultzman L, Tonegawa S. Differential roles of the dopamine  
769 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. Proc Natl Acad Sci.  
770 2014;111: 8245–8250. doi:10.1073/pnas.1407395111
- 771 70. Ohira K, Hayashi M. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. Curr  
772 Neuropharmacol. 2009;7: 276–285. doi:10.2174/157015909790031210  
773



Contents lists available at ScienceDirect

# Applied Animal Behaviour Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/applanim](http://www.elsevier.com/locate/applanim)



## Effect of gender and halothane genotype on cognitive bias and its relationship with fear in pigs

Ricard Carreras<sup>a</sup>, Laura Arroyo<sup>b</sup>, Eva Mainau<sup>a,c</sup>, Raquel Peña<sup>b</sup>, Anna Bassols<sup>b</sup>, Antoni Dalmau<sup>a</sup>, Luigi Faucitano<sup>d</sup>, Xavier Manteca<sup>c</sup>, Antonio Velarde<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> IRTA. Animal Welfare Subprogram, Veïnat de Sies s/n, 17121 Monells, Spain

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Veterinary Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain

<sup>c</sup> Department of Animal and Food Science, School of Veterinary Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain

<sup>d</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke Research Centre, Sherbrooke, QC J1 M 0C8, Canada

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2015  
Received in revised form 13 January 2016  
Accepted 17 January 2016  
Available online xxx

#### Keywords:

Cognitive bias  
Halothane genotype  
Gender  
Fear  
Neurotransmitters

### ABSTRACT

Cognitive bias (CB) has been recently proposed as a tool to study emotions by assessing the cognitive function through behaviour observation. It is based on the premise that subjects in a negative affective state perform more negative judgements about ambiguous stimuli than subjects in positive affective state. This study aimed at investigating if halothane genotype (homozygous Hal-free, NN vs. heterozygous Hal carrier, Nn) and gender (gilts, G vs. entire males, EM) affect the CB in pigs. Moreover, the results of the CB test (CBT) were compared with the results of a novel object test (NOT) in order to assess the influence of fear in the decision taken by pigs during the CBT. The results of both tests were contrasted with the concentration of brain neurotransmitters in four different brain areas in order to analyse the involvement of the dopaminergic and serotonergic pathways on the pigs' affective state and fear. A total of 48 pigs, in terms of 12Hal-free gilts (NNG), 12Hal carrier gilts (NnG), and 12Hal-free entire males (NNEM) and 12Hal carrier entire males (NnEM) were put on the CBT at the age of 20 weeks and on the NOT four days later. After two days, pigs were slaughtered and four brain structures (amygdala, prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus) were dissected for the analysis of brain neurotransmitters. The CBT and NOT results did not show any effect of the genotype and gender or their interaction on pigs' emotional response ( $p > 0.10$ ). However, the CBT correlated positively with the NOT ( $r = 0.49$ ;  $p = 0.0005$ ), with pigs classified with a negative CB tending to be more fearful in front of the novel object than those with a positive CB ( $p = 0.05$ ). Moreover, the pigs that took longer to get in contact with the novel object in the NOT also had lower ( $p = 0.013$ ) concentration of dopamine in the prefrontal cortex and increased DOPAC/dopamine ratio in the hypothalamus ( $p = 0.003$ ). These results suggest that fear level plays an important role in the decision taken by the pig dealing with ambiguous stimuli.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The assessment of the affective state in non-human animals is a crucial goal in the study of animal welfare which has to be unequivocally achieved through behavioural and physiological measures. Several authors have reported a relationship between cognition and emotional state in animals (Boissy and Lee, 2014; Dantzer, 2002; Paul et al., 2005). The concept of cognitive bias (CB) refers to the influence of emotional state on cognition. Whereas, judgement bias, which is the most widely used technique to assess cognitive

bias in animals, refers to the predisposition of an individual to show behaviours indicating anticipation of relatively either positive or negative outcomes in response to ambiguous stimuli (Mendl et al., 2009). Individuals in a negative affective state tend to perform more negative judgements about ambiguous stimuli than individuals in a positive affective state (Eysenck et al., 1991).

Comparing the CB test (CBT) with other techniques used for the assessment of the emotional state it provides a better measure of the valence of the emotion and allows distinguishing between positive and negative emotional states. Moreover, helps avoid the confounding effects of the novel environment on animal behaviour during the test as animals are habituated in a test arena before being tested, and is not invasive (Mendl et al., 2009; Murphy et al., 2014b). However, the CBT is not easily repeatable over time since its

\* Corresponding author. Fax: +34 972 630533.  
E-mail address: [antonio.velarde@irta.cat](mailto:antonio.velarde@irta.cat) (A. Velarde).

ambiguity for pigs is short-lived (Doyle et al., 2011), is time consuming and is difficult to perform in non-experimental, uncontrolled conditions (Murphy et al., 2014b; Seehuus et al., 2013).

A large number of studies have been carried out on CB in several species (Gygax, 2014) based on the methodology for its assessment in non-human animals developed by Harding et al. (2004). As yet, the CB has been used to assess the affective state of farm animals in response to extrinsic factors, such as environmental enrichment (Douglas et al., 2012; Wichman et al., 2012), isolation (Düpjan et al., 2013; Salmeto et al., 2011), restraint (Doyle et al., 2011; Murphy et al., 2013) and handling practices (Daros et al., 2014; Neave et al., 2013; Sanger et al., 2011), and to intrinsic factors, such as genotype, breed or gender.

Several studies have assessed if genotype that is related to anxiety or depression like behaviour have an effect in the response to CBT in rodents (Bolej et al., 2012; Enkel et al., 2010; Kloke et al., 2014; Richter et al., 2012). Other studies assessed the response to CBT between different genders of goats (Briefer and McElligott, 2013) and dogs (Müller et al., 2012). In pigs, the CBT was used to assess the effects of breed and birth weight on their emotional response (Murphy et al., 2013, 2014a). However, to our knowledge, the effects of the gender and the Hal gene on the pigs' response to the CBT are unknown.

The Halothane gene, referred to as the porcine stress syndrome gene, causes malignant hyperthermia, which is usually triggered by stress being more severe in pigs both Nn (heterozygous Hal carrier) and nn (homozygous Hal carrier) than in NN (homozygous Hal-free) (Rosenvold and Andersen, 2003). Indeed, the Hal carrier genotypes have been associated with greater stress sensitiveness in pigs. Moreover, Fàbrega et al. (2004) studied the effect of the Hal genotype in an open field test and demonstrated that Nn pigs performed more locomotive activity compared with NN pigs.

Regarding the gender, van Erp-van der Kooij et al. (2000) found that female piglets were more active than males in a backtest. Moreover other studies have related the gender with differences in emotional behaviour (Gray, 1971) and in the propensity to take risks (Felton et al., 2003).

According to Wichman et al. (2012) and Seehuus et al. (2013), CBT results should be interpreted with caution as they may be confounded by individual parameters, such as fearfulness. Fearfulness may, in fact, have an effect on the perception of the individual animal towards the test, thus influencing the final result of the CBT. An individual in an anxiety or fear-inducing situation may benefit from making 'safety first' judgements when facing ambiguous stimuli (Mendl et al., 2009), which may lead to the interpretation that the response of fearful and anxious individuals to such stimuli may be excessive.

The novel object test (NOT) is commonly used to assess fear or anxiety responses to unfamiliarity (Murphy et al., 2014b). Wichman et al. (2012) found a positive correlation between the results of the CBT and the level of fear assessed with a NOT in laying hens. To our knowledge, such a comparison was never made in pigs.

Brain areas, such as the prefrontal cortex and the amygdala, and the dopaminergic and serotonergic activities are involved in the judgement of ambiguous stimuli (Berridge, 2007; Schultz, 1997) and in the fear response (D'Angio et al., 1988; Davis et al., 1994). The animal's affective state or mood may modulate some or all activities of these brain areas (Mendl et al., 2009; Ruhé et al., 2007). For example, in mice studies, high brain dopamine levels have been associated with positive affective state (Ashby et al., 1999; Burgdorf and Panksepp, 2006), while the absence of D4Rs, a dopamine receptor, has been related to increased avoidance behaviour to novel stimuli (Dulawa et al., 1999; Falzone et al., 2002). To our knowledge, the involvement of brain neurotransmitters (NT) in the pigs'

emotional state in response to the CBT or NOT has never been studied.

The overall objective of this study was to determine the CB in pigs of different gender and carrying or not carrying the Hal gene. In addition, the study aimed to assess to what extent pigs consider ambiguous the stimulus triggered by the contact with a novel object (known object but situated in a new location) in the CBT and the relationship between affective state and fear. Another goal was to assess the involvement of the dopaminergic and serotonergic pathways in the response to judgement and fear.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and housing conditions

In this study, 48 crossbred pigs (Landrace × Large White sows sired with Piétrain boars) were divided into four groups of 12 pigs each. Each group either consisted of Hal-free gilts, Hal-free entire males (NNG and NNEM), Hal carrier gilts and Hal carrier entire males (NnG and NnEM).

At 9 weeks of age, pigs were transported from a commercial farm to the experimental facilities of IRTA (Monells, Spain) and housed separately by gender and genotype in 8 pens (6 pigs per pen). Pigs were kept in pens (5 × 2.7 m) on fully slatted floor under natural light conditions and at a constant environmental temperature of 22 ± 3 °C. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 × 16 cm) connected to a nipple and with a concrete feeder (58 × 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and feed ad libitum. Pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental period. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

### 2.2. Cognitive bias test

At 19 weeks of age, pigs were trained and tested individually for the CB according to the methodology described by Carreras et al. (2015). Twelve training sessions were performed, 6 with access and 6 without access to chopped apples (A and NA sessions, respectively). During the first training session all pigs had access to chopped apples for 10 min. If the pig did not eat them during the first and second A sessions, the apples were put 0.5 m in front of the bucket for 2 min in order to encourage the pig to eat them and learn the association between the bucket and the food. The remaining sessions finished 30 s after the pig ate (in the A sessions) or tried to eat the chopped apples, i.e., contacted the wire mesh with the snout (in the NA sessions) or 90 s after entering the test pen if the pig did not eat or try to eat. Pigs were subjected to two training sessions per day (from 07:00 a.m. to 04:00 p.m.) during 6 consecutive days. During the following two days, two additional A and NA reminder sessions were performed before the test session. The latency to contact the bucket, defined as the time pigs took from entering the test pen to the contact with the bucket, was recorded in all sessions. The pigs that did not learn to discriminate between the two cues after the reminder sessions were excluded from the CBT. The criterion used to exclude pigs from the CBT is described in Carreras et al. (2015). Briefly, pigs were excluded from the study if the mean time during the two A sessions was higher or equal than in the two NA sessions.

After the reminder sessions, each pig was individually subjected to a CBT that finished when the pig ate the chopped apples or 90 s after the pig had entered the test pen. At the end of the CBT, the test pen door was opened and the pig returned to the housing pen. The latency to contact the bucket was also recorded as in the previous sessions.

Pigs were classified according to the latency to contact the bucket during the CBT in relation to the reminder sessions according to the following formula (adapted from Carreras et al., 2015):

$$x/[(y+z)/2] \times 100 = \text{adjusted score}$$

where  $x$  = latency to contact the bucket during the CBT,  $y$  = mean latency to contact the bucket during the A reminder sessions,  $z$  = mean latency to contact the bucket during the NA reminder sessions.

If the adjusted score was  $\leq 75\%$ , the animal was classified with a positive CB (PosCB); if the score was between 75 and 125%, the animal was classified with a neutral CB (NeuCB); and if the score was  $\geq 125\%$  the animal was classified with a negative CB (NegCB).

### 2.3. Novel object test

The novel object test (NOT) was performed in the same test pen four days after the CBT. In this test the novel object was represented by a traffic cone located in the centre of the pen. The traffic cone was filled with concrete in order to prevent pigs from knocking it down for the contact. Each pig was individually kept in the test pen during 5 min. The latency to contact the novel object, defined as the time pigs took from entering the test pen to contact the traffic cone, was recorded. The number of times the pig contacting the novel object (maximum of five times), vocalizations and reluctant to move events (maximum of 20) were also counted. A reluctant to move event was defined as a pig stopping for at least 2 s without showing exploratory behaviour (Dalmau et al., 2009).

These behaviours were both directly noted by one trained observer and video recorded to ensure consistency in the results.

### 2.4. Brain neurotransmitters

Two days after the NOT pigs were fasted for 8 h, transported to the experimental slaughterhouse of IRTA (1.2 km trip), stunned by exposure to 90% CO<sub>2</sub> at atmospheric air for 3 min and exsanguinated. Immediately after slaughter, the brain was removed and the selected brain structures (amygdala, hippocampus, hypothalamus and prefrontal cortex) were dissected and frozen immediately at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

Samples were weighed and homogenized (1:10 w/w) in an ice-cold 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 0.25 M ethylenediaminetetraacetate (EDTA). Dihydroxybenzylamine (DHBA) and N $\omega$ -methyl-5-hydroxytryptamine (N $\omega$ ) were added as internal standards for catecholamines and indolamines, respectively. The mixture was homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) followed by centrifugation at 3000  $\times$  g for 10 min at 4  $^\circ\text{C}$  and the supernatant was kept frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . After centrifugation at 12,000  $\times$  g for 10 min at 4  $^\circ\text{C}$ , the concentrations of noradrenaline, dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and serotonin and its metabolite 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) were determined in 20  $\mu\text{L}$  aliquots using high performance liquid chromatography (HPLC; Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Japan) equipped with a Chromolith Rp-18e 100  $\times$  4.6 mm column (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA). The mobile phase consisted of 0.5 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS) and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 0.4 mV and the flow rate was 1 mL/min.

### 2.5. Statistical analyses

The statistical analysis was carried out with the Statistical Analyses System (SAS V9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002–2008). The significance level was established at  $p < 0.05$  and a tendency was considered at  $0.05 \leq p \leq 0.10$ . Descriptive data are presented with the means of time in s and the standard error (mean  $\pm$  SE).

Normality test of data and residuals was performed for each measure. If data were not parametric, they were log transformed to correct the distribution and when possible parametric statistics were used. The latency to contact the novel object was normally distributed after a log transformation, whereas the latency to contact the bucket during the CBT and the latency to contact the bucket during the training sessions showed a Poisson distribution. The CB classification showed a multinomial distribution. Normally distributed measures were analyzed using the MIXED procedure with Tukey adjustment. Measures with Poisson or multinomial distributions were analyzed using the GENMOD procedure. In all models, each pig was considered as the experimental unit. The fixed effects included in the models were gender (entire male and gilt), genotype (NN and Nn) and their interaction. When the latency to contact the bucket during the training sessions was analyzed, the accessibility to the food (A and NA sessions), the session order (from 2 to 12) and their interaction were also treated as fixed effects. The first training session was not included in the analyses because in this session pigs had access to chopped apples. In the MIXED models, the housing pen was considered as a random effect.

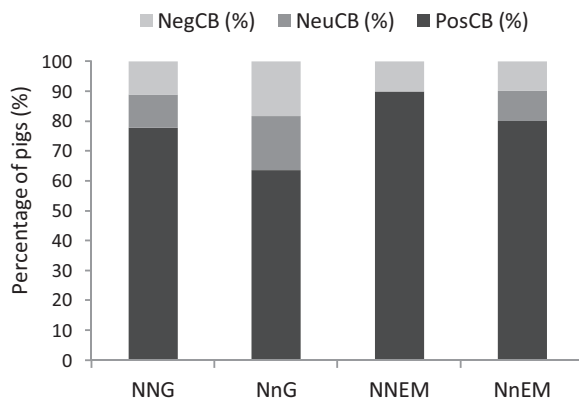
The correlation between the latency to contact the novel object and the latency to contact the bucket during the CBT and the latency to contact the bucket during the A and NA reminder sessions was analysed with the CORR Spearman procedure. The effect of the CB classification (PosCB, NegCB and NeuCB) regarding the latency to contact the novel object was analyzed using the MIXED procedure. The numbers of contacts of the novel object (which followed a multinomial distribution) and the number of vocalizations and reluctant to move events during the NOT (which followed a negative binomial distribution) were analyzed using the GENMOD procedure. Each pig was the experimental unit and in the MIXED model the housing pen was considered as a random effect.

The levels of the NT in each brain area, expressed in ng of NT per g of tissue, were correlated with the latency to contact the bucket during the CBT using the CORR Spearman procedure. The correlations between the NT concentrations and the latency to contact the novel object during the NOT were calculated using the CORR Pearson procedure when NT concentrations followed a normal distribution, before or after a log transformation, and a CORR Spearman procedure when they were not parametric. The MIXED procedure was used to compare the NT concentrations between pigs classified as PosCB, NeuCB and NegCB when they followed a normal distribution. Whereas, the GENMOD procedure was used when NT concentrations did not follow a normal distribution and followed a negative binomial distribution.

## 3. Results

### 3.1. Cognitive bias test

The latency to contact the bucket during the A training sessions was lower ( $p < 0.0001$ ) than in the NA sessions starting from training session 10 ( $30.38 \pm 2.58$  s vs.  $58.41 \pm 2.38$  s; data not shown) meaning that pigs had learned to discriminate between A and NA at the end of the training programme. However, 9 pigs (3 NNG, 1 NnG, 2 NNEM and 3 NnEM) were not able to discriminate between A and NA positions during the reminder sessions and were, therefore, excluded from the CBT. No differences between genders ( $p = 0.384$ )



**Fig. 1.** Percentage of pigs classified as negative (NegCB), neutral (NeuCB) and positive (PosCB) to cognitive bias according to gender (*G* = gilts and EM = entire males) and Hal genotype (NN = halothane-free, Nn = halothane carrier genotype).

and Hal genotypes ( $p=0.950$ ), and no effect of their interaction ( $p=0.456$ ) were found regarding the latency to contact the bucket during the training and reminder sessions.

The proportion of pigs classified as PosCB, NeuCB and NegCB for each treatment group is shown in Fig. 1. The proportion of CB classes was not affected by gender ( $p=0.278$ ), genotype ( $p=0.358$ ) and their interaction ( $p=0.560$ ).

The mean latency to contact the bucket during the CBT was  $19.08 \pm 3.23$  s and was neither affected by gender ( $p=0.610$ ) nor genotype ( $p=0.789$ ). No significant interaction between these two factors was found either ( $p=0.701$ ). This latency was not different from the mean latency to contact the bucket during the A reminder sessions either ( $19.05 \pm 3.64$  s;  $p=0.994$ ), whereas it was different from the mean latency to contact the bucket during the NA reminder sessions ( $53.55 \pm 4.34$  s;  $p < 0.0001$ ).

### 3.2. Novel object test

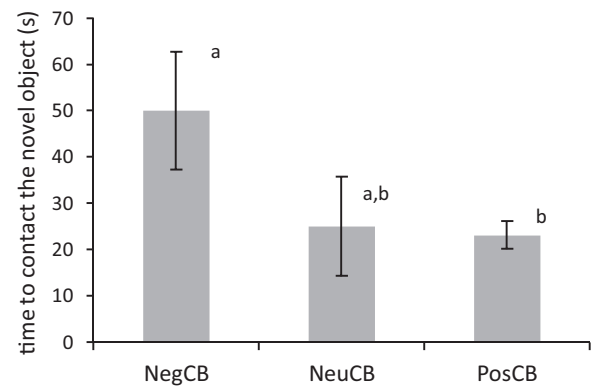
The mean latency to contact the novel object during the NOT was  $26.10 \pm 2.98$  s and was neither affected by the gender ( $p=0.611$ ) nor genotype ( $p=0.228$ ), no significant interaction between them was found either ( $p=0.614$ ).

The latency to contact the novel object during the NOT was positively correlated with the latency to contact the bucket during the CBT ( $r=0.49$ ;  $p=0.0005$ ). However, there was neither correlation between the latency to contact the novel object and the mean latency to contact the bucket during the A reminder sessions ( $r=0.244$ ;  $p=0.1$ ) nor with the mean latency to contact the bucket during the NA reminder sessions ( $r=0.167$ ;  $p=0.256$ ).

Regarding the CB classification, NegCB pigs tended to take longer ( $p=0.05$ ) to contact the novel object than PosCB pigs. Pigs of the NeuCB class did not differ in the latency to contact the novel object compared with NegCB and PosCB pigs (Fig. 2). Moreover, no differences were found in relation to the number of times that pigs contacted the novel object, the number of vocalizations and the number of reluctant to move events during the NOT (Table 1).

### 3.3. Brain neurotransmitters

The NT levels did not vary between CB classes (Table 2). Moreover, there was no significant correlation between the time to contact the bucket in the CBT and any NT in any of the four brain areas (amygdala, prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus;  $p > 0.10$ ). Whereas, in the NOT, significant correlations were found between the latency to contact the novel object and some brain NT, with pigs showing a longer latency to contact the novel object presenting lower concentration of dopamine in the



**Fig. 2.** The mean time  $\pm$  Standard Error in s of the latency to contact the novel object during the novel object test of the animals classified as negative (NegCB), neutral (NeuCB) and positive (PosCB) to cognitive bias. Different letters show significant differences ( $p < 0.05$ ).

prefrontal cortex ( $r=-0.374$ ;  $p=0.013$ ) and higher DOPAC/dopamine ratio in the hypothalamus ( $r=0.466$ ;  $p=0.003$ ).

## 4. Discussion

A positive correlation between the latency to contact the bucket during the CBT and the latency to contact the novel object during the NOT was found in this study. Wichman et al. (2012) also observed a similar correlation between the latency to peck at the bowl near a rewarded ambiguous cue in the CBT and the latency to contact the novel object in laying hens. In agreement with Wichman et al. (2012), our results suggest that fear plays an important role in the CBT outcomes. The pigs classified as NegCB in this study took more time to contact the novel object during the NOT, which indicates that they were more fearful in front of a novel stimulus than PosCB pigs.

Although CBT and the NOT results are correlated, no correlation was found between the latency to contact the novel object during the NOT and the latency to contact the bucket during the A and NA reminder sessions of the CBT. These results suggest that the ambiguous stimulus during the CBT is perceived by pigs as more novel than the known rewarded and unrewarded stimuli during the reminder sessions (Mendl et al., 2009). This correlation, thus, can be explained by the individual differences in the fear state while judging the ambiguous stimuli. Therefore, our results suggest that responses in front of ambiguous stimuli are more affected by the level of fear rather than other intrinsic factors, such as gender or genotype.

Interestingly, pigs showing a longer latency to contact the novel object in the NOT also presented decreased dopamine concentration in the prefrontal cortex and increased DOPAC/dopamine ratio in the hypothalamus. This physiological response may be associated with the greater level of fear in front of the unknown in these pigs. The greater DOPAC/dopamine ratio results from the relatively decreased dopamine levels with respect to its metabolite DOPAC may suggest that the dopamine degradation pathway to DOPAC and HVA is more active than the degradation pathway to noradrenaline (Kandel et al., 2013). Dopamine is involved in the mechanisms modulating states of fear and anxiety (Espejo, 2003), and, more specifically, dopaminergic activity plays a role in fear development, expression and extinction. Dopamine activity in the prefrontal cortex is involved in the neuromodulation of cognitive functions and its role is critical for fear extinction (Abraham et al., 2014). Indeed, prefrontal cortex dopamine is increased following fear extinction (Espejo, 2003). Dulawa et al. (1999) found similar results in mice comparing the behavioural response in front a NOT between

**Table 1**

Variation of behaviours (mean  $\pm$  S.E.; in s) between pigs classified as negative (NegCB), neutral (NeuCB) and positive (PosCB) to the cognitive bias test during the novel object test.

	NegCB	NeuCB	PosCB	P value
Contacts to the novel object, n	3.25 $\pm$ 0.48	4.60 $\pm$ 0.24	3.63 $\pm$ 0.24	0.704
Vocalizations, n	5.75 $\pm$ 3.33	6.4 $\pm$ 3.66	5.63 $\pm$ 1.27	0.839
Reluctant to move events, n	1.75 $\pm$ 0.63	1.00 $\pm$ 0.77	2.20 $\pm$ 0.63	0.470

**Table 2**

Concentrations of the neurotransmitters (mean  $\pm$  S.E.; in ng/g tissue) in each brain region of negative (NegCB), neutral (NeuCB) and positive (PosCB) to cognitive bias test pigs.

	Variable <sup>a</sup>	NegCB	NeuCB	PosCB	p value
Amygdala	NA	213.7 $\pm$ 23.09	146.8 $\pm$ 9.60	210.9 $\pm$ 11.71	0.106
	DA	416.7 $\pm$ 66.42	366.3 $\pm$ 39.77	464.1 $\pm$ 27.79	0.673
	DOPAC	416.7 $\pm$ 66.42	84.3 $\pm$ 7.69	90.2 $\pm$ 4.97	0.718
	HVA	294.5 $\pm$ 28.44	364.4 $\pm$ 26.07	358.9 $\pm$ 16.02	0.445
	5-HT	1229.4 $\pm$ 226.41	942.0 $\pm$ 80.78	1153.1 $\pm$ 57.46	0.532
	5-HIAA	315.3 $\pm$ 226.42	294.4 $\pm$ 80.78	316.8 $\pm$ 57.46	0.866
Prefrontal cortex	NA	174.1 $\pm$ 14.95	164.1 $\pm$ 17.29	161.4 $\pm$ 4.78	0.531
	DA	13.0 $\pm$ 1.18	18.7 $\pm$ 6.39	25.4 $\pm$ 4.10	0.337
	DOPAC	8.2 $\pm$ 2.14	15.2 $\pm$ 4.82	15.3 $\pm$ 1.77	0.266
	HVA	28.6 $\pm$ 4.58	67.1 $\pm$ 20.26	71.1 $\pm$ 6.99	0.112
	5-HT	343.9 $\pm$ 28.05	310.1 $\pm$ 60.57	323.0 $\pm$ 8.13	0.264
	5-HIAA	108.9 $\pm$ 28.05	111.7 $\pm$ 60.57	114.8 $\pm$ 8.13	0.636
Hippocampus	NA	170.2 $\pm$ 20.57	193.2 $\pm$ 20.57	177.9 $\pm$ 7.10	0.621
	DA	28.5 $\pm$ 5.25	27.9 $\pm$ 4.07	27.2 $\pm$ 1.08	0.984
	DOPAC	3.1 $\pm$ 1.36	4.0 $\pm$ 0.90	3.4 $\pm$ 0.29	0.641
	HVA	26.8 $\pm$ 2.26	30.8 $\pm$ 5.09	31.1 $\pm$ 1.87	0.747
	5-HT	355.8 $\pm$ 39.07	388.6 $\pm$ 18.80	336.3 $\pm$ 13.18	0.396
	5-HIAA	126.6 $\pm$ 39.07	150.2 $\pm$ 18.80	133.0 $\pm$ 13.18	0.548
Hypothalamus	NA	2092.9 $\pm$ 559.29	2268.4 $\pm$ 524.60	2495.9 $\pm$ 182.75	0.669
	DA	695.1 $\pm$ 59.69	537.9 $\pm$ 158.12	540.7 $\pm$ 57.62	0.687
	DOPAC	130.7 $\pm$ 50.95	77.0 $\pm$ 26.57	93.6 $\pm$ 9.87	0.636
	HVA	429.6 $\pm$ 55.01	382.3 $\pm$ 75.76	419.9 $\pm$ 36.91	0.894
	5-HT	821.8 $\pm$ 151.80	620.4 $\pm$ 131.74	771.2 $\pm$ 60.97	0.601
	5-HIAA	647.7 $\pm$ 151.79	304.4 $\pm$ 131.74	447.5 $\pm$ 60.98	0.299

<sup>a</sup> NA: noradrenaline; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA: homovanillic acid; 5-HT: serotonin; 5-HIAA: 5-hydroxyindole-3-acetic acid.

D4R-knock-out (inhibition of a dopamine receptor) and wild-type mice. They found that D4R-knock-out mice showed decrease exploration in front novelty. Moreover, Falzone et al. (2002) also found that D4R-knock-out mice showed heightened avoidance to the more fear-provoking areas of the elevated plus maze and the light/dark preference exploration test compared with the control group.

Likewise Carreras et al. (2015), at the end of the training period of this study, pigs were able to learn to discriminate between a positive and a negative cue based on its location. However, this learning capability was independent from their gender and genetic background. Müller et al. (2012) also failed to find an effect of the gender on the learning process of dogs in the CBT. Whereas, Briefer and McElligott (2013) reported a faster learning skill in female than in male goats during the training for the judgement bias task. Sex differences in spatial abilities have been also largely reported in rodent species, with males giving better results than females (Roof, 1993; Williams and Meck, 1991). Furthermore, the lack of difference of learning capability between NN and Nn pigs was also reported by Dantzer and Mormede (1978). The low level of handling stress during the training sessions and the habituation of the pigs to the test conditions during the first training sessions of the CBT may have levelled the differences between the two genotypes in this study.

No difference was found between genotypes and genders in CB during the CBT in this study. Murphy et al. (2013) did not find differences in judgement bias between pigs and minipigs either. The lack of the effect of the Hal gene on pigs' CB as assessed in the CBT is surprising based on the results of a number of behaviour studies indicating a greater locomotive activity and exploratory behaviour in pigs carrying the Hal gene (nn or Nn) compared with non-carrier genotypes (Fàbrega et al., 2004; Robert and Dallaire,

1986; Schaefer et al., 1989). These results either suggest that Nn and NN pigs do not differ in the affective state or that the CBT efficiency is species-specific and thus may not be an appropriate method for the assessment of CB in pigs. Indeed, the CBT successfully showed differences between genotypes in rat studies. Enkel et al. (2010) and Richter et al. (2012) using the "learned helplessness" genetic rat model of depression in which the experience of uncontrollable stress leads to a helpless state with depression-like symptoms found a more negative response in front of an ambiguous stimulus in helpless rats than non-helpless rats.

The lack of difference in the affective state as assessed by the CBT between entire males and gilts found in this study agrees with other previous behavioural studies involving these two genders of pigs (Hessing et al., 1993; van Erp-van der Kooij et al., 2000). Studies on dogs and goats using CB techniques did not find gender differences either (Briefer and McElligott, 2013; Müller et al., 2012).

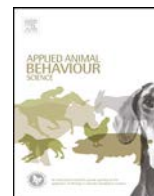
In this study, 76.9% of pigs responded positively in front of the ambiguous cue. Moreover, the mean latency to contact the bucket during the CBT did not differ from the mean latency to contact the bucket during the A reminder sessions, while it did during NA reminder sessions. These results suggest that the mild severity of the unrewarded reinforcer may predispose the pig to assume little risk when exposed to the ambiguous cue (Mendl et al., 2009). Therefore, the motivation for exploration exceeds the potential fear aversion of the stimulus (Asano, 1986). If a more severe unrewarded reinforcer, such as an air puff (Brajon et al., 2015; Svendsen et al., 2012) or an electric shock (Enkel et al., 2010; Rygula et al., 2013), was applied fewer pigs may have been classified as PosCB in this study.

In agreement with the results of the behavioural tests, pigs showing different CB classification did not present differences in



- Paul, E.S., Harding, E.J., Mendl, M., 2005. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 469–491, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.01.002>.
- Richter, S.H., Schick, A., Hoyer, C., Lankisch, K., Gass, P., Vollmayr, B., 2012. A glass full of optimism: enrichment effects on cognitive bias in a rat model of depression. *Cognit. Affect. Behav. Neurosci.* 12, 527–542, <http://dx.doi.org/10.3758/s13415-012-0101-2>.
- Robert, S., Dallaire, A., 1986. An exploratory study of behavioural differences between young pigs susceptible and non-susceptible to stress syndrome. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 16, 335–343, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(86\)90005-5](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(86)90005-5).
- Roof, R.L., 1993. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav. Brain Res.* 53, 1–10, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80261-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80261-X).
- Rosenvold, K., Andersen, H.J., 2003. Factors of significance for pork quality—a review. *Meat Sci.* 64, 219–237, [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00186-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00186-9).
- Ruhé, H.G., Mason, N.S., Schene, A.H., 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol. Psychiatry* 12, 331–359, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001949>.
- Rygula, R., Papciak, J., Popik, P., 2013. Trait pessimism predicts vulnerability to stress-induced anhedonia in rats. *Neuropsychopharmacology* 38, 2188–2196, <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.116>.
- Salmeto, A.L., Hymel, K.a., Carpenter, E.C., Brilot, B.O., Bateson, M., Sufka, K.J., 2011. Cognitive bias in the chick anxiety-depression model. *Brain Res.* 1373, 124–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.007>.
- Sanger, M.E., Doyle, R.E., Hinch, G.N., Lee, C., 2011. Sheep exhibit a positive judgement bias and stress-induced hyperthermia following shearing. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 131, 94–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.02.001>.
- Schaefer, A.L., Sather, A.P., Tong, A.K.W., Lepage, P., 1989. Behaviour in pigs from three genotypes segregating at the halothane locus. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 23, 15–25, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(89\)90003-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(89)90003-8).
- Schultz, W., 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593–1599, <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>.
- Seehuus, B., Mendl, M., Keeling, L.J., Blokhuis, H., 2013. Disrupting motivational sequences in chicks: are there affective consequences? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 148, 85–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2013.07.008>.
- Sharot, T., Guitart-Masip, M., Korn, C.W., Chowdhury, R., Dolan, R.J., 2012. How dopamine enhances an optimism bias in humans. *Curr. Biol.* 22, 1477–1481, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.053>.
- Svendsen, P.M., Malmkvist, J., Halekoh, U., Mendl, M., 2012. Responses of mink to auditory stimuli: prerequisites for applying the cognitive bias approach. *Behav. Processes* 91, 291–297, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2012.09.010>.
- Wichman, A., Keeling, L.J., Forkman, B., 2012. Cognitive bias and anticipatory behaviour of laying hens housed in basic and enriched pens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 140, 62–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.05.006>.
- van Erp-van der Kooij, E., Kuijpers, A.H., Schrama, J.W., Ekkel, E.D., Tielen, M.J., 2000. *Individual behavioral characteristics of pigs and their impact on production*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 125, 649–652.
- Williams, C.L., Meck, W.H., 1991. The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. *Psychoneuroendocrinology* 16, 155–176, [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4530\(91\)90076-6](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4530(91)90076-6).





# Housing conditions do not alter cognitive bias but affect serum cortisol, qualitative behaviour assessment and wounds on the carcass in pigs



Ricard Carreras<sup>a</sup>, Eva Mainau<sup>a,b</sup>, Laura Arroyo<sup>c</sup>, Xènia Moles<sup>a</sup>, Joel González<sup>d</sup>, Anna Bassols<sup>c</sup>, Antoni Dalmau<sup>a</sup>, Luigi Faucitano<sup>e</sup>, Xavier Manteca<sup>b</sup>, Antonio Velarde<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> IRTA, Animal Welfare Subprogram, Veinat de Sies, s/n, 17121 Monells, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal and Food Science, School of Veterinary Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Veterinary Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

<sup>d</sup> IRTA, Product Quality Program, Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

<sup>e</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke Research and Development Centre, Sherbrooke J1M 0C8, Canada

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 April 2016

Received in revised form 30 August 2016

Accepted 11 September 2016

Available online 14 September 2016

### Keywords:

Cognitive bias

Pigs

Housing conditions

Qualitative behaviour assessment

Cortisol

Carcass wounds

## ABSTRACT

Measures of animal emotions are essential to assess animal welfare. Recently, the cognitive bias technique has been proposed as a measure of animal affective state. This technique is based on the premise that subjects in negative affective states make more negative judgements about ambiguous stimuli than subjects in positive affective states. In the present study, 44 female pigs were divided into two groups of equal size (22 pigs each): one group was allocated in enriched housing conditions (more space allowance, presence of straw and solid floor) and the other in barren housing conditions (lower space allowance and slatted floor) in order to induce differences in the affective state. Three cognitive bias tests (CBT) based on spatial discrimination were performed: 1 week before starting the housing conditions (CBT1) and 1 and 5 weeks (CBT2 and CBT3, respectively) after it. Moreover, 3 and 4 days after each CBT, a qualitative behaviour assessment (QBA) and a serum sampling for the assessment of cortisol concentration were carried out. Finally, the number of wounds was counted on the pig carcass at slaughter. The results showed that the cognitive bias did not differ between treatment groups in any of the two CBT carried out after starting the housing conditions ( $p > 0.05$ ). However, during the CBT2 and CBT3 when compared with the barren group the enriched group presented a lower concentration of serum cortisol ( $p = 0.008$  and  $p = 0.011$ , respectively), a higher QBA score ( $p = 0.022$  and  $p = 0.027$ , respectively) and a lower number of wounds on the carcass ( $p = 0.05$ ). Considering the QBA, serum cortisol and carcass wounds results, the CBT used in this study was not valid or not sensitive enough to assess the variation in the affective state between pigs raised in different housing conditions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Assessing the affective state in animals has become one of the most important challenges for the animal welfare scientific community during the last decades. As animals cannot report their feelings, scientists have developed and tested several behavioural and physiological measures in order to assess animal emotions. Although these measures offer a great deal of information, to fully understand animals' affective state the cognitive component must be also considered (Paul et al., 2005). The term cognitive bias has been used as a general label for the effects of the affective state

on the cognitive processes (Mendl et al., 2009). A large number of studies in humans have reported how emotional states can bias different cognition processes, such as attention, memory or judgement (Bradley et al., 1997; Mineka et al., 1998). Based on these findings, Harding et al. (2004) first reported the effect of the affective state on judgement in rats being exposed to unpredictable housing using a cognitive bias test (CBT). Their results showed that rats exposed to unpredictable housing, widely demonstrated to induce a mild stress/depression-like state, perceived the ambiguous stimulus as more negative than rats exposed to predictable housing. Since this first experiment, a large number of studies have been carried out in different species (for a review see Baciadonna and McElligott, 2015; Gygax, 2014; Mendl et al., 2009). Among the different treatments that have been performed to induce changes in affective state, the manipulation of housing conditions is one of

\* Corresponding author.

E-mail address: [antonio.velarde@irta.cat](mailto:antonio.velarde@irta.cat) (A. Velarde).

the most used. Indeed, the effect of different housing conditions on the cognitive bias has been assessed in several species, such as rats (Brydges et al., 2011; Burman et al., 2008), European starlings (Bateson and Matheson, 2007; Matheson et al., 2008), sheep (Vögeli et al., 2014), laying hens (Wichman et al., 2012), horses (Löckener et al., 2016) and pigs (Douglas et al., 2012; Scollo et al., 2014). Some of these studies confirmed the hypothesis that animals raised in better housing conditions have a more positive cognitive bias (Bateson and Matheson, 2007; Brydges et al., 2011; Douglas et al., 2012; Löckener et al., 2016; Matheson et al., 2008), while others failed to report so (Burman et al., 2008; Scollo et al., 2014; Wichman et al., 2012).

Providing the housing pen with enrichment, and particularly with rooting material, such as straw, is known to have a positive effect on pigs' welfare (De Jong et al., 1998; Scott et al., 2006). Indeed, straw offers a recreational and nutritional stimulus, and bedding (Fraser et al., 1991). Moreover, floor characteristics are known to have an effect on some behavioural patterns, the type and the prevalence of body lesions, and the health of pigs (Kilbride et al., 2009). For example, pigs housed on slatted floor reduced significantly the time devoted to floor exploration, redirecting this behaviour towards other pen features and their pen mates (Averós et al., 2010a). Higher stocking density also has a negative effect on pigs based on both behavioural and physiological indicators (Averós et al., 2010a,b; Jensen et al., 2010). Indeed, stocking density is known to be an important risk factor for tail-biting (Moinard et al., 2003).

Scientific evidences on the effects of stocking density on cognitive bias in pigs are unclear, ranging from no effect (Scollo et al., 2014) to a more positive cognitive bias in pigs provided with more space, solid floor, straw and objects to manipulate compared with those raised at lower space allowance and on partially slatted floor (Douglas et al., 2012). Some authors suggest that changing housing conditions may have an immediate effect on affective state, although this effect appears to disappear over time (Löckener et al., 2016). Whereas, other authors suggest that to alter the affective state through the housing conditions, animals must experience a drop or an improvement in the environmental quality (Bateson and Matheson, 2007).

The qualitative behaviour assessment (QBA) is a method based on the ability of human observers to integrate perceived animal behaviours using 20 descriptors such as 'relaxed', 'tense', 'frustrated' or 'active'. Previous research has shown that this technique has high inter- and intra- observer reliability and is coherent with other behaviour and welfare measures (Rousing and Wemelsfelder, 2006; Wemelsfelder et al., 2001). Temple et al. (2011) found that Iberian pigs raised in extensive conditions were in more positive mood than Iberian pigs raised in intensive conditions according to the QBA results.

Animals raised in barren housing conditions are might be expected to have higher concentrations of serum cortisol since they are potentially exposed to more stressful situations (Möstl and Palme, 2002). However, the results about the effects of the environmental enrichment in the pen on serum cortisol concentration in pigs are rather inconclusive, ranging from a positive effect (Janssens et al., 1994), to none (Pearce and Paterson, 1993; Scollo et al., 2014) or negative (De Jong et al., 1998). Indeed, there are a number of factors which can influence the concentration of this indicator such as the time of day/night, physical activity, health, feeding or temperature and humidity, hindering the assessment of a specific treatment effect on this hormone.

Barren housing conditions are known to promote harmful social behaviour, aggressions and higher stress levels in pigs, leading to altered carcass and meat quality (van de Weerd and Day, 2009). One of the measures that can be used to assess such effects is the number of wounds on the carcass, however other factors, such as,

the way pigs are transported from the farm to the slaughterhouse and the mixing of pigs during the lairage at the slaughterhouse can mask the effects caused by the type of housing conditions.

The aim of the present study was to assess if pigs raised in enriched housing conditions, i.e. lower stocking density, solid floor and presence of straw, showed a more positive affective state as assessed by the CBT and QBA and had lower serum cortisol concentration and number of wounds on the carcass than those raised in more barren housing conditions, i.e. higher stocking density, slatted floor and no provision of enrichment material.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and housing conditions

A total of 44 female pigs aged 8 weeks originating from the same commercial farm were housed in four pens of 11 animals each at the experimental facilities of IRTA (Monells, Spain). Pigs were crosses of Large White × Landrace with Piétrain heterozygous. During 7 weeks, pigs were kept in the same housing conditions, which consisted in a fully slatted floor with a space allowance of 1.2 m<sup>2</sup>/pig. During the following 8 weeks, in two pens this density was maintained (enriched treatment), but the floor changed to concrete and 700 g of chopped straw/pig were provided every 2–3 days, while in the other two pens space allowance was reduced to 0.7 m<sup>2</sup>/pig (barren treatment). Pedersen et al. (2014) found that the straw amount identified to meet the pigs' need to explore was close to 400 g per pig and day. During the experiment, pigs were housed under natural light conditions at an environmental range temperature of 22 ± 3 °C. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 × 16 cm) connected to a nipple and a concrete feeder (58 × 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and food *ad libitum* and were inspected daily. At 23 weeks of age, pigs were transported to the experimental slaughterhouse of IRTA (1.2 km trip) in pen groups. Afterwards, a 1 h lairage was carried out maintaining the housing pen groups and pigs were stunned by exposure to 90% CO<sub>2</sub> at atmospheric air for 3 min and exsanguinated afterwards. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

### 2.2. Cognitive bias test

Three cognitive bias tests (CBT) were carried out: one 2 weeks before changing the housing conditions (CBT1) and the other two after 1 and 5 weeks (CBT2 and CBT3, respectively) while pigs were in the new housing conditions. Pigs were trained and tested individually for the CBT according to the methodology described by Carreras et al. (2016).

#### 2.2.1. Habituation and training sessions

Before carrying out the training and the test sessions, pigs were habituated to the test pen (habituation sessions), first in groups, that is, all the pigs of each pen were moved from the housing pen to a 31.5 m<sup>2</sup> test pen (4.7 length × 6.7 m width) and remained there for 1 h during 2 consecutive days. During the 2 following days, pigs were habituated to the test pen individually, that is, each pig was moved from the housing pen to the test pen and remained there for 5 min. During the individual habituation sessions, a bucket with chopped apples was presented in front of one side (left or right) of the wall opposite to the pen door. The bucket was presented on the left side for half of the pigs and on the right side for the other half, following a balanced pattern for each housing pen. If the pig did not eat the chopped apples after the 5 min of habituation an experimenter entered the pen and put three apple chops half meter in front of the bucket. Later on, the experimenter left the pen and 3 more min were provided. After the habituation sessions, pigs

performed 44 training sessions, 22 with access to chopped apples (rewarded session; R) and 22 without access to chopped apples (punishment session; P). A line was drawn on the floor 1 m around each bucket location. During the P sessions, when the front legs of a pig crossed back over the line, an air puff was blown from the wall just over the bucket to the pig's face until it escaped (i.e. crossed back the line). Half of the pigs had the R location on the right and the other half had it on the left side according to the position of the bucket during the habituation sessions. Each pig performed two R and two P sessions per day. The training sessions finished 30 s after the pig crossed the line around the bucket with the front legs or 90 s after entering the test pen if the pig did not cross it. The latency to cross the line around the bucket, defined as the time taken by the pigs from the entrance into the test pen to cross the line around the bucket with the front legs, was recorded in all sessions. At the completion of the training sessions, the CBT1 was performed. Twelve training sessions (6 R and 6 P) were carried out before both the CBT2 and CBT3. Pigs that did not learn to discriminate between R and P after the end of each training sessions were excluded from the CBT. Following the criterion described by Carreras et al. (2015), pigs were excluded from the CBT if the mean time taken to cross the line around the bucket in the last two R sessions was equal or longer than in the last two P sessions.

### 2.2.2. Cognitive bias test (CBT)

The three CBT were performed following the same procedures. Two R, two P and one test session were performed each day during 5 days. Those R and P sessions were defined as reminder sessions. The order of these five sessions was random for each day. There were three test locations, one in the middle between R and P (M test) that was presented for 3 days, one between the R and the middle (R test) and the other between the P and the middle (P test) that were presented one day each. An M test was presented to all pigs during the first day, the other two M tests and the P test and R test were randomly distributed during the other 4 days. In all tests the bucket was empty. The sessions finished 30 s after the pig crossed the line around the bucket with the front legs or 90 s after entering the test pen if the pig did not cross it. As in the training sessions, the latency to cross the line around the bucket was recorded in all sessions.

### 2.3. Qualitative behaviour assessment (QBA)

Three QBA were carried out during the experiment, 3 days after each CBT (QBA1, QBA2 and QBA3). The QBA was performed following the Welfare Quality® protocol (Welfare Quality®, 2009) using descriptive terms with an expressive connotation to reflect animals' experience of a situation (Wemelsfelder, 2007). Each pen was observed for 10 min by a trained observer and a rating scale of 125 mm was used to score the pigs in each pen based on 20 behaviour terms, namely active, relaxed, fearful, agitated, calm, content, tense, enjoying, frustrated, sociable, bored, playful, positively occupied, listless, lively, indifferent, irritable, aimless, happy and distressed. A global score for each pen was obtained introducing all term scores in a formula described in the Welfare Quality® Assessment protocol for pigs (Welfare Quality®, 2009). Based on this formula, the higher the score obtained, the higher is the positive emotional state. More detailed information about the overall methodology of assessment and score obtained can be found in the Welfare Quality® Assessment protocol for pigs (2009).

### 2.4. Serum cortisol concentration analysis

Serum samples were collected on farm at three different times, 4 days after each CBT (S1, S2 and S3) and at the time of slaughter (S4) in all pigs at 9:00 a.m. blood samples were collected in

10 mL tubes without anticoagulant by cava venepuncture using a vacutainer needle at the farm and during exsanguination at the slaughterhouse. Blood was allowed to clot and serum was obtained by centrifugation at 2,000 xg for 10 min and it was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Cortisol concentrations were determined using commercial ELISA kits (DRG Diagnostics, Marburg, Germany).

### 2.5. Wounds on the carcass

The number of wounds on the carcass in each pig was assessed using the Welfare Quality® protocol for pigs (Dalmau et al., 2009) considering five anatomical regions (ears, front, middle, hind-quarters and legs) on one side of each carcass. No distinction was made between old and fresh wounds. Scores of 0 (<2 lesions in all regions), 1 (2–10 lesions in at least one region) and 2 (>10 lesions in at least one region) were given for each carcass by a trained observer on the slaughter line after scalding.

### 2.6. Statistical analyses

The Statistical Analyses System (SAS V9.2; software SAS Institute Inc., Cary, NC; 2002–2008) was used to analyse data and the significance threshold was  $\leq 0.05$ . Descriptive data are presented with the mean and the standard error (mean  $\pm$  SE).

Normality test of data and residuals was performed for each measure. If data were not parametric, they were log transformed to correct the distribution and, when possible, parametric statistics were used. The latency to cross the line around the bucket during the CBT showed a Poisson distribution and was analyzed using a GLIMMIX procedure (nonlinear model), whereas serum cortisol concentration and the QBA score were normally distributed after a log transformation and was analyzed using a MIXED procedure (general linear mixed model). The score obtained from the number of wounds on the carcass showed a multinomial distribution and was analyzed using a GLIMMIX procedure. Each pig was considered as the experimental unit in all models, except for the QBA, whose data were analyzed considering the housing pen as the experimental unit. When the latency to cross the line around the bucket during the training sessions was analyzed, the accessibility to the food (R and P sessions), the session order and their interaction were treated as fixed effects. In the analysis of the latency to cross the line around the bucket during each reminder (R and P) and test sessions (R test, P test and M test), the treatment (enriched vs. barren housing), the CBT (CBT2 and CBT3) and their interaction were included as fixed effects and the latency to contact the bucket during the CBT1 was considered as a co-variable. In the analysis of the serum cortisol concentrations, the treatment (enriched vs. barren housing), the sampling order (S2, S3 and S4) and their interaction were included as fixed effects and the serum cortisol concentrations during S1 were considered as a co-variable. When the QBA scores were analyzed, the treatment (enriched vs. barren housing), the QBA (QBA2 and QBA3) and their interaction were included as fixed effects and the QBA1 as a co-variable.

## 3. Results

During the CBT1, when compared with P training sessions, the latency to cross the line around the bucket during R training sessions was lower starting from training session 4 ( $36.26 \pm 7.30$  s vs.  $58.90 \pm 6.93$  s;  $p = 0.014$ ), meaning that the pigs learned to discriminate between the two reinforcers from this session onwards. However, after the 44 training sessions three pigs (6.82%) were not able to discriminate between R and P, therefore the outputs of the CBT1 of those pigs were excluded from the analyses. Regarding the training sessions of the CBT2 and CBT3, pigs were able to discriminate between R and P from training session 1 ( $p < 0.0001$  in both

**Table 1**  
Latency to cross the line around the bucket (mean  $\pm$  S.E.; in s) in each cognitive bias test (CBT) for the two treatment groups (enriched vs. barren housing).

	Session	Housing conditions		P-value
		Enriched (n=22)	Barren (n=22)	
CBT1 <sup>a</sup> (co-variable)	R reminder <sup>b</sup>	16.51 $\pm$ 1.95	9.24 $\pm$ 1.35	–
	R test <sup>b</sup>	16.14 $\pm$ 5.68	11.95 $\pm$ 5.17	–
	M test <sup>b</sup>	14.88 $\pm$ 3.32	20.50 $\pm$ 4.08	–
	P test <sup>b</sup>	44.09 $\pm$ 8.44	37.18 $\pm$ 8.18	–
	P reminder <sup>b</sup>	79.42 $\pm$ 1.61	82.76 $\pm$ 1.42	–
CBT2 <sup>a</sup>	R reminder	15.24 $\pm$ 1.82	6.37 $\pm$ 0.85	0.007
	R test	17.71 $\pm$ 6.45	6.14 $\pm$ 0.73	0.060
	M test	16.83 $\pm$ 3.13	20.38 $\pm$ 3.54	0.579
	P test	40.90 $\pm$ 7.29	49.27 $\pm$ 8.54	0.394
	P reminder	77.90 $\pm$ 1.79	85.90 $\pm$ 1.05	0.029
CBT3 <sup>a</sup>	R reminder	11.64 $\pm$ 1.41	7.90 $\pm$ 1.06	0.778
	R test	10.24 $\pm$ 2.53	19.10 $\pm$ 6.28	0.119
	M test	22.11 $\pm$ 3.60	24.58 $\pm$ 3.76	0.822
	P test	53.95 $\pm$ 8.26	57.95 $\pm$ 8.42	0.664
	P reminder	82.74 $\pm$ 1.41	86.51 $\pm$ 0.92	0.096

<sup>a</sup> Cognitive bias test 1 (CBT1) was carried out 2 weeks before changing the housing conditions and cognitive bias test 2 (CBT2) and cognitive bias test 3 (CBT3) were carried out 1 and 5 weeks after.

<sup>b</sup> R reminder: rewarded reminder; R test: rewarded test, between the rewarded reminder and the middle test positions; M test: middle test, between the rewarded and the punishment reminder positions; P test: punishment test, between the punishment reminder and the middle test positions; P reminder: punishment reminder.

trials) and in this case, two (4.55%) and one (2.27%) pigs were not able to discriminate between the two reinforcers, respectively, and therefore were excluded from the analyses.

The mean latencies to cross the line around the bucket for each session during the three CBT for each treatment group are presented in Table 1. When the CBT2 and CBT3 results are compared, the latency to cross the line around the bucket was only lower in the barren group for the R test in the CBT2 (6.14  $\pm$  0.73 s vs. 19.10  $\pm$  6.28 s;  $p$  = 0.03).

The means of the QBA scores of the two pens of each treatment and the means of the serum cortisol concentrations of all pigs of each treatment are presented in Table 2 and in Table 3, respectively. No difference in the serum cortisol concentration and the QBA score was found between S2, S3 and S4 and between QBA2 and QBA3 for each treatment group ( $p$  > 0.05; data not shown). Inter-assay coefficient of variation of cortisol samples was 8.6%.

Pigs in the enriched group presented a lower score obtained from the number of wounds on the carcass than pigs in the barren group (0.82  $\pm$  0.12 vs. 1.18  $\pm$  0.12;  $p$  = 0.05).

#### 4. Discussion

In this study, the latency to cross the line around the bucket did not differ between the enriched and the barren group for any test session (R test, M test and P test) in any CBT (CBT2 and CBT3). These results are in contrast with those reported by Douglas et al. (2012) who found that pigs housed in enriched conditions (1.9 m<sup>2</sup> of space per pig, solid floor, straw and several objects to manipulate) had a more positive cognitive bias compared with pigs housed in barren conditions (1.2 m<sup>2</sup> of space per pig, partially slatted floor and some wood to manipulate) may be due to the use of different forms of CBT and different timescales. The lack of differences between groups in the present study may suggest that the CBT is not valid or sensitive (as defined by Martin and Bateson, 1993) enough to assess variation of the affective state between pigs raised in different housing conditions. Indeed, Scollo et al. (2014) also failed to find differences in the latency to reach the bucket between groups of pigs raised at different densities.

**Table 2**  
Qualitative behaviour assessment scores (QBA) (mean  $\pm$  S.E.) in the two treatment groups (enriched vs. barren housing).

Housing conditions	Enriched		P-value
	Enriched (n=2)	Barren (n=2)	
QBA1 <sup>a</sup> (co-variable)	44.50 $\pm$ 7.50	47.50 $\pm$ 8.42	–
QBA2 <sup>a</sup>	67.60 $\pm$ 11.30	23.90 $\pm$ 2.45	0.022
QBA3 <sup>a</sup>	77.40 $\pm$ 4.10	31.80 $\pm$ 1.50	0.027

<sup>a</sup> QBA1: score obtained 2 weeks before changing the housing conditions; QBA2: 1 week after changing the housing conditions; QBA3: score obtained 5 weeks after changing the housing conditions.

In this study, when compared with the barren group, the enriched group took longer time during the R reminder sessions and shorter time during the P reminder sessions of the CBT2 to cross the line around the bucket. These results are surprising as pigs of both groups were trained to differentiate these stimuli in the same way and contrast with the common thinking about the beneficial effect of the environmental enrichment on animals' learning abilities (van Praag et al., 2000; Young, 2003). Thus, these results suggest that pigs raised in barren housing conditions had better abilities to learn about the reinforcement of both R and P stimuli compared with pigs raised in enriched conditions. An explanation may be the greater motivation of barren pigs to compete for resources they are not used to (Pedersen et al., 2002), resulting in a greater stimulation to discriminate between the two stimuli more accurately compared with pigs raised in an enriched environment.

Interestingly, the time taken by the pigs in the barren group to cross the line around the bucket in the R test was lower in the CBT2 compared with the CBT3. This result suggests that raising pigs in barren housing conditions may alter their cognitive bias after a certain period of time (i.e. 5 weeks). Those results are opposite to the ones reported by Löckener et al. (2016) that suggested that cognitive bias differences between horses housed in different conditions were only found just after changing those conditions but disappear after a certain period of time. Indeed, during the CBT3 pigs were 20 weeks old and heavier than during the CBT2, making the reduced space allowance a resource to compete for. It is known that the competition for space in the pen results in stress in pigs (Turner et al., 2000) and may have a negative effect on the affective state of the pigs in the barren group.

In this study, pigs learned to discriminate between R and P stimuli after four training sessions, that are faster (10 training sessions) than in previous studies carried out at the same research facilities (Carreras et al., 2015, 2016). The introduction of the air puff in the P sessions aiming at increasing the severity of the negative reinforcer and balance the value between the negative and the positive reinforcers (Mendl et al., 2009) may have helped to speed up the learning process and discriminate between the positive and the negative stimuli, increasing the efficiency of the CBT (Murphy et al., 2014). Moreover, similarly to Carreras et al. (2015), during CBT2 and

**Table 3**  
Serum cortisol concentrations (mean  $\pm$  S.E.; in ng/mL) in the two treatment groups (enriched vs. barren housing).

Housing conditions	Enriched		P-value
	Enriched (n=2)	Barren (n=2)	
S1 <sup>a</sup> (co-variable)	23.16 $\pm$ 2.88	24.69 $\pm$ 3.45	–
S2 <sup>a</sup>	18.32 $\pm$ 2.64	27.98 $\pm$ 3.07	0.008
S3 <sup>a</sup>	16.06 $\pm$ 2.06	25.25 $\pm$ 3.43	0.011
S4 <sup>a</sup>	18.06 $\pm$ 2.36	20.52 $\pm$ 2.29	0.527

<sup>a</sup> S1: sampling 1, carried out 2 weeks before changing the housing conditions; S2: sampling 2, carried out 1 week after changing the housing conditions; S3: sampling 3, carried out 5 weeks after changing the housing conditions; S4: sampling at slaughter.

CBT3 pigs were able to remember the discrimination task from the first training session, while the percentage of pigs excluded from the CBT due to their incapacity to discriminate between R and P sessions was lower than that reported in previous studies (Carreras et al., 2015, 2016). A reason may be the larger number of training sessions (44) carried out before performing the CBT1 compared with previous studies (12–14; Carreras et al., 2015, 2016).

As expected, when compared with the barren group, pigs from the enriched group showed greater QBA scores in both QBA2 and QBA3. Temple et al. (2011) also found that Iberian pigs raised in extensive conditions had more positive mood than Iberian pigs raised in intensive conditions, suggesting that in both studies the QBA distinguished the type of housing conditions on the basis of expression of natural behaviour. Moreover, it has been suggested that housing conditions may have an effect on the observer's perception of welfare that would systematically associate pigs housed in enriched conditions to a more positive affective state. However, Wemelsfelder et al. (2009) have shown that QBA in pigs are sensitive to contextual bias, but that this sensitivity does not seriously distort observer characterizations of pig expression.

The enriched group had lower serum cortisol concentration than the barren group in both S2 and S3 according to our hypothesis. Pigs with more space are supposed to suffer less stress as they have to compete less for space (Anil et al., 2007) and therefore reduce the incidence of aggressive behaviour. Moreover the access to straw, allow them rooting, which is known to be a natural behaviour (Fraser et al., 1991), and also reduces the incidence of tail biting (EFSA, 2007). The results are in accordance with Janssens et al. (1994) that demonstrated that pigs in enriched housing conditions had lower serum cortisol concentration compared with the pigs in barren housing conditions. Even though experimenters were very careful when taking samples, there is still the possibility that the sampling procedure stressed the animals, raising their cortisol levels and masking cortisol differences due to housing conditions.

The number of wounds on the body was also higher in pigs in the barren group compared with pigs in the enriched group. Other authors have reported more number of lesions in pigs confined in higher densities (e.g. Janssens et al., 1994; Turner et al., 2000). Anil et al. (2007) described two probable reasons for higher number of lesions when space is reduced: competition for resting space and competition to gain access to a feeder and maintain it even if feeding is ad libitum. The short distance between the experimental farm and the slaughterhouse and the maintenance of the housing groups during the lairage probably allowed that those factors did not mask the effect of housing conditions on the number of wound on the carcass of those pigs. So all lesions, old and fresh ones, were considered, assuming they mainly took place in the pens.

## 5. Conclusions

The enriched housing conditions applied in this study produced a more positive affective state in pigs than the barren ones as shown by better QBA scores, lower serum cortisol concentration and lower number of skin lesions on the carcass. However, the CBT failed to support these results suggesting that as carried out in this experiment it was not a valid or not a sufficiently sensitive measure to detect emotional variation in pigs raised in different housing conditions.

## Acknowledgments

This study was funded by the Spanish Government (project AGL2010-21578-C03-01 and AGL2010-21578-C03-02). The authors thank the staff of the experimental facilities at IRTA for

the technical support in the data and sample collection during the experiments.

## References

- Anil, L., Anil, S.S., Deen, J., 2007. Effects of allometric space allowance and weight group composition on grower-finisher pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 87, 139–151, <http://dx.doi.org/10.4141/a06-051>.
- Averós, X., Brossard, L., Dourmad, J.Y., de Greef, K.H., Edge, H.L., Edwards, S.A., Meunier-Salaün, M.C., 2010a. Quantitative assessment of the effects of space allowance, group size and floor characteristics on the lying behaviour of growing-finishing pigs. *Animal* 4, 777–783, <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731109991613>.
- Averós, X., Brossard, L., Dourmad, J.-Y., de Greef, K.H., Edge, H.L., Edwards, S. a., Meunier-Salaün, M.-C., 2010b. A meta-analysis of the combined effect of housing and environmental enrichment characteristics on the behaviour and performance of pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 127, 73–85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2010.09.010>.
- Baciadonna, L., McElligott, A.G., 2015. The use of judgement bias to assess welfare in farm livestock. *Anim. Welf.* 24, 81–91, <http://dx.doi.org/10.7120/09627286.24.1.081>.
- Bateson, M., Matheson, S.M., 2007. Performance on a categorisation task suggests that removal of environmental enrichment induces pessimism in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Anim. Welf.* 116, 33–36.
- Bradley, B.P., Mogg, K., Lee, S.C., 1997. Attentional biases for negative information in induced and naturally occurring dysphoria. *Behav. Res. Ther.* 35, 911–927, [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-7967\(97\)00053-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-7967(97)00053-3).
- Brydges, N.M., Leach, M., Nicol, K., Wright, R., Bateson, M., 2011. Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. *Anim. Behav.* 81, 169–175, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.09.030>.
- Burman, O.H.P., Parker, R., Paul, E.S., Mendl, M., 2008. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. *Anim. Behav.* 76, 801–809, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.02.014>.
- Carreras, R., Mainau, E., Rodríguez, P., Llonch, P., Dalmau, A., Manteca, X., Velarde, A., 2015. Cognitive bias in pigs: individual classification and consistency over time. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 10, 577–581, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2015.09.001>.
- Carreras, R., Arroyo, L., Mainau, E., Peña, R., Bassols, A., Dalmau, A., Faucitano, L., Manteca, X., Velarde, A., 2016. Effect of gender and halothane genotype on cognitive bias and its relationship with fear in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 177, 12–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2016.01.019>.
- Dalmau, A., Temple, D., Rodríguez, P., Llonch, P., Velarde, A., 2009. Application of the Welfare Quality® protocol at pig slaughterhouses. *Appl. Behav.* 18, 497–505.
- De Jong, I.C., Ekkel, E.D., Van De Burgwal, J. a., Lambooi, E., Korte, S.M., Ruis, M., a, W., Koolhaas, J.M., Blokhuis, H.J., 1998. Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs. *Physiol. Behav.* 64, 303–310, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00066-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00066-3).
- Douglas, C., Bateson, M., Walsh, C., Bédoué, A., Edwards, S.A., 2012. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 139, 65–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.02.018>.
- EFSA, 2007. Scientific report on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems. *EFSA J.* 611, 1–13.
- Fraser, D., Phillips, P.A., Thompson, B.K., Tennessen, T., 1991. Effect of straw on the behaviour of growing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 30, 307–318, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90135-K](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(91)90135-K).
- Gygas, L., 2014. The A to Z of statistics for testing cognitive judgement bias. *Anim. Behav.* 95, 59–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.06.013>.
- Harding, E.J., Paul, E.S., Mendl, M., 2004. Animal behavior—cognitive bias and affective state. *Nature* 427, 312, <http://dx.doi.org/10.1038/427312a>.
- Janssens, C.J., Helmond, F.A., Wiegant, V.M., 1994. Increased cortisol response to exogenous adrenocorticotrophic hormone in chronically stressed pigs: influence of housing conditions. *J. Anim. Sci.* 72, 1771–1777 (1994.7271771x).
- Jensen, M.B., Studnitz, M., Pedersen, L.J., 2010. The effect of type of rooting material and space allowance on exploration and abnormal behaviour in growing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 123, 87–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2010.01.002>.
- Kilbride, A., Gillman, C., Ossent, P., Green, L., 2009. Impact of flooring on the health and welfare of pigs. *Practice* 31, 390–395.
- Löckener, S., Reese, S., Erhard, M., Wöhr, A., 2016. Pasturing in herds following housing in horseboxes induces a positive cognitive bias in horses. *J. Vet. Behav.* 11, 50–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2015.11.005>.
- Möstl, E., Palme, R., 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 67–74, [http://dx.doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00146-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00146-7).
- Martin, P.R., Bateson, P., 1993. The reliability and validity of measures. In: *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*, 2nd ed. University Press, Cambridge, Cambridge, pp. 114–124.
- Matheson, S.M., Asher, L., Bateson, M., 2008. Larger, enriched cages are associated with optimistic response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 109, 374–383, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.007>.
- Mendl, M., Burman, O.H.P., Parker, R.M. a., Paul, E.S., 2009. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: emerging evidence and underlying mechanisms. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 118, 161–181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.023>.

- Mineka, S., Watson, D., Clark, L.A., 1998. Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. *Annu. Rev. Psychol.* 49, 377–412.
- Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J., Green, L.E., 2003. A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 333–355, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00276-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00276-9).
- Murphy, E., Nordquist, R.E., van der Staay, F.J., 2014. A review of behavioural methods to study emotion and mood in pigs, sus scrofa. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 159, 9–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.002>.
- Paul, E.S., Harding, E.J., Mendl, M., 2005. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 469–491, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.01.002>.
- Pearce, G.P., Paterson, A.M., 1993. The effect of space restriction and provision of toys during rearing on the behaviour, productivity and physiology of male pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 36, 11–28, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90095-7](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(93)90095-7).
- Pedersen, L.J., Jensen, M.B., Hansen, S.W., Munksgaard, L., Ladewig, J., Matthews, L., 2002. Social isolation affects the motivation to work for food and straw in pigs as measured by operant conditioning techniques. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 77, 295–309, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00066-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00066-7).
- Pedersen, L.J., Herskin, M.S., Forkman, B., Halekoh, U., Kristensen, K.M., Jensen, M.B., 2014. How much is enough? The amount of straw necessary to satisfy pigs' need to perform exploratory behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 160, 46–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.008>.
- Rousing, T., Wemelsfelder, F., 2006. Qualitative assessment of social behaviour of dairy cows housed in loose housing systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101, 40–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2005.12.009>.
- Scollo, A., Gottardo, F., Contiero, B., Edwards, S.A., 2014. Does stocking density modify affective state in pigs as assessed by cognitive bias, behavioural and physiological parameters? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 153, 26–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2014.01.006>.
- Scott, K., Taylor, L., Gill, B.P., Edwards, S.A., 2006. Influence of different types of environmental enrichment on the behaviour of finishing pigs in two different housing systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 99, 222–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2005.10.013>.
- Temple, D., Manteca, X., Velarde, A., Dalmau, A., 2011. Assessment of animal welfare through behavioural parameters in Iberian pigs in intensive and extensive conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 131, 29–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.01.013>.
- Turner, S.P., Ewen, M., Rooke, J.A., Edwards, S.A., 2000. The effect of space allowance on performance, aggression and immune competence of growing pigs housed on straw deep-litter at different group sizes. *Livestock Prod. Sci.* 66, 47–55, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00159-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00159-7).
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–198, <http://dx.doi.org/10.1038/35044558>.
- van de Weerd, H.A., Day, J.E.L., 2009. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 1–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.001>.
- Vögeli, S., Lutz, J., Wolf, M., Wechsler, B., Gyax, L., 2014. Valence of physical stimuli, not housing conditions, affects behaviour and frontal cortical brain activity in sheep. *Behav. Brain Res.* 267, 144–155, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.036>.
- Welfare Quality, 2009. *Welfare Quality applied to growing and finishing pigs. In: Dalmau, A., Velarde, A., Scott, K., Edwards, S., Veissier, I., Keeling, L., Butterworth, A. (Eds.), Welfare Quality Assessment Protocol for Pigs. Welfare Quality Consortium, The Netherlands.*
- Wemelsfelder, F., Hunter, T.E., Mendl, M.T., Lawrence, A.B., 2001. Assessing the whole animal: a free choice profiling approach. *Anim. Behav.* 62, 209–220, <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.2001.1741>.
- Wemelsfelder, F., Nevison, I., Lawrence, A.B., 2009. The effect of perceived environmental background on qualitative assessments of pig behaviour. *Anim. Behav.* 78, 477–484, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.06.005>.
- Wemelsfelder, F., 2007. How animals communicate quality of life: the qualitative assessment of behaviour. *Anim. Welf.* 16, 25–31.
- Wichman, A., Keeling, L.J., Forkman, B., 2012. Cognitive bias and anticipatory behaviour of laying hens housed in basic and enriched pens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 140, 62–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.05.006>.
- Young, R.J., 2003. *Environmental Enrichment for Captive Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.