

## **CORTISOL EN SALIVA COMO INDICADOR DE ESTRÉS EN PORCINO SALIVARY CORTISOL TO ASSESS STRESS IN PIGS**

Martín, P., Ovejero<sup>1</sup>, I., Mateos<sup>1</sup>, A. y Villarroel<sup>1</sup>, M.

<sup>1</sup>Dpto. Producción Animal, Campos de Prácticas, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, C/Senda del Rey s/n, 28040 Madrid. [paulamfs@gmail.com](mailto:paulamfs@gmail.com)

**RESUMEN:** El primer objetivo de este estudio fue evaluar la medida 'cortisol en saliva' como un indicador no invasivo del nivel de Bienestar Animal en cerdos en cebo. El segundo objetivo fue evaluar el efecto que un procedimiento rutinario, al que los animales se ven sometidos en condiciones comerciales, como es el pesaje, tiene en la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Se tuvieron en cuenta los posibles efectos del tipo genético (línea comercial A y B), el sexo, la fecha y la hora de toma de muestras, y el tipo de suelo en el que se alojaron los animales. Se usaron dos tipos de suelo, el primero constaba de zona continua de hormigón y slats de hormigón (CC) y el segundo de zona continua de hormigón recubierta de resina epoxi y slats metálicos (MS). En primer lugar, se tomaron muestras control de saliva, de un cerdo de cada box de las 4 salas, durante la mañana y la tarde, en 3 días no consecutivos, con un total de 96 muestras. En segundo lugar se tomaron muestras de saliva inmediatamente después del pesaje, a la hora y a las 2 horas, con un total de 144 muestras. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de cortisol basal; en cambio, después del pesaje, el nivel de cortisol fue significativamente menor en los animales alojados en suelo RM ( $p < 0,01$ ) que en los animales alojados en suelo CC. El nivel de cortisol tras el pesaje en los animales alojados en suelo RM mostró una tendencia normal decreciente con el paso de las horas, mientras que, el nivel de cortisol aumentó con el paso de las horas para los animales alojados en suelo CC.

**PALABRAS CLAVE:** Bienestar, cerdos, cortisol en saliva.

**SUMMARY:** The first aim of the present study was to evaluate the measure 'salivary cortisol' as a non invasive Animal Welfare indicator for fattening pigs. The second objective was to assess the effect of a commercial farm routine procedure (weighing) in the HPA axis activation. The effect of the breeding line (breeding line A and B), the sex, the date and hour of the sampling, and the different flooring systems used in the housing were taken into account. Two types of partly-slatted housing were used, continuous concrete floor and concrete slat (CC) and continuous solid floor of concreted recovered with epoxy resin and metallic slat (RM). Firstly, salivary control samples were taken in 1 pig per pen on three different days during fattening (morning and afternoon) for a total of 96 samples. Secondly, another salivary cortisol sample was taken after weighing each pig, 0h, 1h and 2h after weighing (stressful situation) near the end of fattening, in 3 pigs per pen, for a total of 144 samples. There were no differences in baseline cortisol levels for pigs on either flooring but, after the weighing, the cortisol level of the animals housed in the RM flooring were significantly lower ( $p < 0,01$ ) than the cortisol level of the animals housed in the CC flooring, and showed a normal decreasing tendency whereas the level of cortisol of animals housed in the CC flooring showed a rising tendency.

**KEYWORDS:** Welfare, pigs, salivary cortisol.

### **INTRODUCCIÓN**

En los modernos sistemas intensivos de cebo de cerdos los animales están expuestos a muchos factores de estrés que pueden afectar a su salud y bienestar. Los problemas de estrés surgen mayoritariamente debido a problemas de manejo y de las instalaciones.

Tras una situación estresante el sistema autónomo (SA) responde de manera inmediata causando la liberación de adrenalina en sangre. En el eje HPA, la liberación de CRH por parte del hipotálamo causa la producción de ACTH por la pituitaria, lo cual aumenta la producción de cortisol por la glándula adrenal.

El cortisol actúa por retroalimentación negativa sobre la CRH y la ACTH, por lo que en condiciones normales, tras el estrés, hay una aclimatación y reajuste para intentar volver a la normalidad. El efecto escalera ocurre cuando queda un estrés residual del anterior desafío y el animal no se ha podido reajustar fisiológicamente a niveles normales (*staircase effect*), (Squires, 2003). Estudios han encontrado que la modificación por estrés crónico del ritmo circadiano del cortisol tiene efectos sobre la respuesta al estrés del eje HPA, mostrando tras una situación de estrés un nivel mayor de cortisol los animales con bienestar más empobrecido (de Jong et al., 2000).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se alojaron 84 hembras y 84 machos sin castrar en el Laboratorio de Bienestar Porcino de los Campos de Prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, que consta de cuatro salas independientes. Cada sala tiene 6 boxes (7 animales/box), con suelo parcialmente enrejillado: el primero constaba de zona continua de hormigón y slats de hormigón (CC) y el segundo de zona continua de hormigón recubierta de resina epoxi y slats metálicos (MS). La ventilación fue mecánica por extracción 'bajo suelo'. Para medir el nivel basal de cortisol, se utilizaron cuatro boxes por sala (se excluyeron los dos boxes correspondientes a animales más pequeños) y se tomaron muestras de saliva de un cerdo de cada box, dos veces al día (mañana y tarde) durante tres días no consecutivos: 24/06 (día 86 de cebo), 28/06 (día 90) and 01/07 (día 93). De esta manera, se tomaron 4 muestras en cada sala por la mañana (10h00) y otras 4 muestras por la tarde (18h00), con un total de 24 muestras por día (4 salas) y 96 muestras en total. La media del peso vivo de los cerdos en los días que se tomaron muestras fue de 85,47 kg (día 86), 89,05 kg (día 90), 91,73 kg (día 93).

A continuación, tomamos muestras de saliva después de un procedimiento rutinario estresante como es el pesaje. Los animales fueron pesados por última vez el día 16/07 (día 108) con un peso medio 104,65 kg y ese mismo día se tomaron muestras de saliva de los cerdos usados para medir el nivel basal de cortisol (control) así como de otros dos cerdos por box, a tres horas distintas, inmediatamente después del pesaje, una hora después y dos horas después, con un total de 144 muestras.

Para tomar las muestras de saliva se usó un 'Salivette' (Sarstedt, Aktiengesellschaft and Co., Numbrecht, Alemania), que consta de un *ependorf* de doble fondo. Ya que su uso está destinado a humanos, reemplazamos el algodón cilíndrico por un algodón específico de uso veterinario. El algodón fue introducido en la boca del cerdo, dejando que el animal lo masticara hasta que quedase completamente humedecido (aproximadamente 30 segundos) y procurando que el tiempo de recogida de la saliva nunca superase los 2 minutos, para evitar que haya un efecto de la toma de muestras en los resultados (Morrison et al., 2007). En las dos horas siguientes a la toma de muestras estas fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos (SORVALL Superspeed (RC2-B) Automatic Refrigerated Centrifuge). Una vez centrifugadas se retiró el algodón y las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis.

La concentración de cortisol en las muestras de saliva fue analizada usando un ELISA de competición. La curva estándar se creó a partir de 4 muestras control y cuatro muestras de animales inmediatamente después de ser pesados. Las concentraciones se expresan en ng/ml. El anticuerpo fue inmovilizado en la fase sólida durante 16 horas, la reacción de competición fue llevada a cabo durante 2 horas y el substrato fue hidrolizado durante 5 minutos. La temperatura durante la inmovilización del anticuerpo fue de 4°C y de 20-22°C para el resto de procesos.

Los datos fueron analizados con SAS v.9.1. (SAS Institute, Cary, NC, USA). Se utilizó un procedimiento MIXED con medias repetidas y matriz de covarianza AR (1). Como unidad

experimental se consideró el animal y el box como efecto aleatorio. Los efectos fijos considerados fueron genética, sexo, fecha, hora y suelo para las muestras control y genética, sexo, hora y suelo para las muestras después del pesaje, así como sus interacciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles basales de cortisol fueron similares en todos los animales. En cambio, se hallaron diferencias significativas en el nivel de cortisol después del pesaje. El nivel de cortisol de los animales alojados en suelo CC fue significativamente mayor después del pesaje ( $p < 0,01$ ) que el de los animales alojados en suelo RM (Tabla 1). Además el estudio de la caída de la concentración del cortisol con el paso de las horas mostró que esta caída sólo ocurrió en los animales alojados en suelo RM (Figura 1).

De los resultados se puede concluir que la medida del cortisol en saliva en una situación control puede ser interesante de cara a compararlo con el nivel de cortisol después de una situación estresante, pero no para utilizarlo como un indicador en sí mismo de Bienestar, ya que para ello, se necesitaría más información sobre niveles de referencia de cortisol en saliva en función del tipo genético, sexo, peso, etc., además de un estudio del ritmo circadiano de la concentración de cortisol (de Jong et. al 2000). En cambio, de los resultados de la concentración de cortisol tras una situación estresante, como es el pesaje, se puede concluir que los animales en suelo RM tuvieron una mayor capacidad para restablecer su nivel basal de cortisol que los animales alojados en suelo CC, lo que pudo ser debido a que los slats metálicos facilitan la pérdida de calor corporal (Ovejero, 2002), tras el estrés producido por el incremento de la actividad física que conlleva el pesaje y las altas temperaturas del día del mismo (máxima 27,4 °C); es decir que los slats metálicos aportasen un mayor confort térmico a los animales, en comparación con los slats de hormigón.

Por tanto, y de acuerdo con Merlot et al. (2011), se puede concluir que el cortisol en saliva es un buen indicador para determinar el efecto sobre el Bienestar de procedimientos rutinarios a los que los animales se ven expuestos en situaciones comerciales, y que además este indicador podría aplicarse para evaluar el efecto de las condiciones ambientales en el transporte sobre el Bienestar (Brown et al. 2005), ya que uno de los principales factores que afectan negativamente al bienestar en transporte son las condiciones medioambientales extremas (Schwartzkopf-Genswein et al. 2012) y según los resultados parece existir una relación entre el nivel de cortisol tras una situación estresante y el confort térmico posterior a ella.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown, S.N., Knowles, T.G., Wilkins, L.G., Chadd, S.A. & Warriss, P.D., 2005. The response of pigs to being loaded or unloaded onto commercial animal transporters using three systems. *Vet J.* 170: 91-100.
- de Jong, I.C., Prella, I.T., van de Burgwal, J.A., 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. *Physiol Behav.* 68: 571-578.
- Merlot, E., Mounier, A.M. & Prunier, A., 2011. Endocrine response of gilts to various common stressors: A comparison of indicators and methods of analysis. *Physiol Behav.* 102: 259-265.
- Morrison, R. S., Johnston, L. J. & Hilbrands, A. M., 2007. The behaviour, welfare, growth performance and meat quality of pigs housed in a deep-litter, large group housing system compared to a conventional confinement system. *App Anim Behav Sci.* 103: 12-24.
- Ovejero, I. 2002. La gestión del las explotaciones dedicadas al cebo en el ganado porcino. La gestión en la explotación ganadera. *Zootecnia. Bases de Producción Animal* (Buxadé, C., coord.). Mundiprensa. 187-207.
- Schwartzkopf-Genswein, K.S., Faucitano, L., Dadgar, S., Shand, P., González, L.A. & Crowe, T.G., 2012. Road transport of cattle, swine and poultry in North

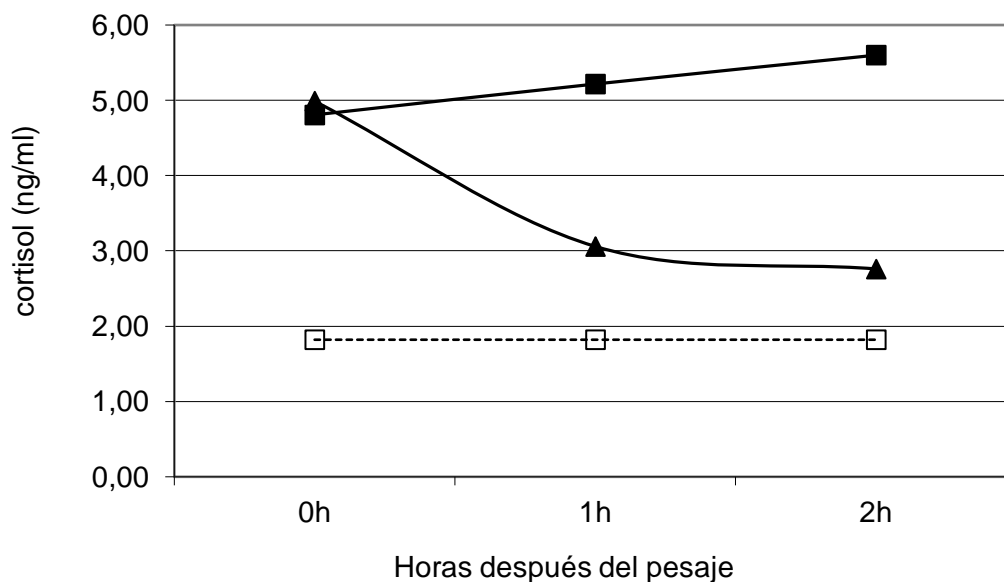
America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. Meat Sci. 92: 227-243. • Squires EJ. 2003. Applied animal endocrinology. CAB International, Oxon, UK.

**Agradecimientos:** El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto conjunto Universidad-Empresa para el desarrollo del Laboratorio de Bienestar Porcino, que engloba a un grupo de investigadores de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) y a la Empresa de Transformación Agraria, S.A. (TRAGSA). También se agradece a NEWGAN su aportación.

**Tabla 1. Medias del nivel de cortisol tras estrés (ng/ml) en función de la hora, del sexo, del tipo genético y del tipo de suelo<sup>1</sup>**

$\bar{X}$ Hora				EEM	$\bar{X}$ Sexo			EEM	$\bar{X}$ Genética			$\bar{X}$ Suelo			EEM
0h	1h	2h	p		M	H	p		A	B	p	CC	RM	p	
4,90	4,14	4,15	-	0,451	4,79	3,99	-	0,362	4,43	4,35	-	5,19	3,60	**	0,366

Tabla1. \*\* $p < 0,01$ ; (-) NS. <sup>1</sup>Medias de mínimos cuadrados. EEM: Error estándar de la media. p: probabilidad (análisis de varianza). Hora (horas tras pesaje). Suelo (CC: hormigón-hormigón, RM: resina-metal).



**Figura 1. Concentraciones de cortisol en saliva de cerdos alojados en suelo continuo de hormigón con slats de hormigón (■), en suelo continuo de hormigón recubierto de resina y slats metálicos (▲) y cerdos control en ambos tipos de suelo (□, sin pesar).**