

Efecto del tipo de suelo del alojamiento sobre el cortisol en saliva de cerdos de cebo

Aranzazu Mateos¹, Alba Peláez², Eduardo de Mercado³, Emilio Gómez³, Ismael Ovejero¹.

¹Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Avda. Puerta de Hierro, 2-4. 28040 Madrid. España. a.mateos@upm.es; ismael.ovejero.rubio@upm.es.

²Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid. España. albapela@ucm.es.

³Centro de Pruebas de Porcino. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Riaza – Toro s/n. 40353 Hontalbilla, Segovia. España. ita-merpened@itacyl.es; gomizqem@itacyl.es.

Resumen

El bienestar de los animales es una preocupación creciente en la producción intensiva de ganado porcino; en ella, los cerdos están expuestos a diversos factores estresantes entre los que se pueden encontrar las condiciones de alojamiento. La concentración de cortisol en saliva, que sigue un ritmo circadiano condicionado por la edad, es una variable utilizada para evaluar la respuesta de los animales a las situaciones de estrés.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia del tipo de suelo, en un alojamiento con enrejillado parcial, sobre los niveles de cortisol por la mañana y por la tarde de cerdos en cebo a dos pesos (y edades) diferentes (60 kg y 100 kg de peso vivo; 3,6 y 5,0 meses de edad, respectivamente).

Se han utilizado 144 cerdos (72 machos enteros y 72 hembras) alojados, con separación de sexos, en boxes (seis cerdos/box; 1,2 m²/cerdo) con suelo parcialmente enrejillado (suelo continuo: 60 %; enrejillado: 40 %). Los suelos han sido de dos tipos: uno, suelo continuo de hormigón + enrejillado de hormigón (HH), y el otro, suelo continuo de resina epoxídica + enrejillado metálico (RM).

En los animales más jóvenes, los niveles de cortisol en saliva de la mañana fueron mayores que los de la tarde; en cambio, sucedió lo contrario para los animales de más edad. Los niveles de cortisol en saliva por la mañana y por la tarde fueron numéricamente mayores en los cerdos alojados sobre suelo RM que en los alojados sobre suelo HH, tanto a los 60 como a los 100 kg de peso vivo, pero las diferencias solo fueron significativas a los 60 kg para la determinación de la mañana ($p = 0,0393$). Además, en los animales alojados sobre suelo RM el ritmo circadiano fue más aplanado que en los alojados sobre suelo HH. Puede concluirse que el suelo RM resultó más estresante para los cerdos que el suelo HH.

Palabras clave: bienestar, suelo parcialmente enrejillado, porcino.

Effect of floor type on salivary cortisol of fattening pigs

Abstract

Animal welfare is a growing concern in intensive pig production; on this kind of production system, pigs are exposed to various stressors among which can be found the housing conditions. The salivary cortisol concentration, which follows a circadian rhythm conditioned by age, is a useful biomarker to evaluate the animals response to stress situations.

The aim of this work was to evaluate the effect of the floor type in a partially slatted floor facility, on the salivary cortisol concentrations, in the morning and in the afternoon, in fattening pigs, at two different weights (and ages): 60 kg and 100 kg of live weight (3.6 and 5.0 months of age, respectively).

144 pigs (72 entire males and 72 females) were used. Pigs were housed in 24 single-sex pens (6 pigs/pen; 1.2 m²/pig) with partially slatted floor (60% continuous and 40 % slatted). The pens floors were of two types: one with concrete continuous floor and concrete slats (HH), and the other with concrete covered with epoxy resin continuous floor and metal slats (RM).

In younger animals, salivary cortisol concentrations in the morning were higher than in the afternoon; however, the opposite happens for older animals. Salivary cortisol levels in the morning and in the afternoon were numerically higher in pigs housed in RM floor than in HH floor, both at 60 and 100 kg live weight, but only significant differences were found for 60 kg live weight and morning sampling ($p = 0.0393$). In addition, in animals housed on RM soil the circadian rhythm was more flattened than in animals housed on HH floor. It could be concluded that RM floor was more stressful for pigs than HH floor.

Keywords: welfare, partially slatted floor, pig.

1. Introducción

El bienestar de los animales es una preocupación creciente en la producción intensiva de ganado porcino. En las modernas granjas de cebo, los animales se encuentran sometidos a numerosos factores estresantes, a menudo ligados al manejo que reciben y a las condiciones de alojamiento.

En situaciones de estrés, aumenta la actividad corticoadrenal de los cerdos y, consecuentemente, se incrementan las concentraciones circulantes de cortisol. Tradicionalmente, en los trabajos de investigación sobre el bienestar animal, se ha utilizado la concentración del cortisol sanguíneo como indicador de la respuesta al estrés; sin embargo, las necesarias captura y retención de los animales para la obtención de las muestras de sangre son, en sí mismas, importantes factores estresantes (Nyberg et al., 1988).

El cortisol presente en la saliva refleja la fracción libre (la activa biológicamente) del cortisol sanguíneo, y se ha demostrado que los niveles de cortisol en la saliva y en el plasma sanguíneo están bien correlacionados (Cook et al., 1996); además, la toma de muestras de saliva es un método no invasivo y, por tanto, no estresante para los animales. Por ello, la determinación del cortisol en saliva es un indicador de la respuesta al estrés de los cerdos cada vez más utilizado en los estudios relacionados con su bienestar.

Una de las condiciones de alojamiento que puede tener efecto sobre el bienestar de los cerdos es el tipo de suelo de los corrales (De Jong et al., 1998; Marin et al., 2005; Merlot et al., 2010). Por otra parte, los niveles basales de las concentraciones de cortisol en sangre y saliva muestran un ritmo circadiano (Evans et al., 1988; Ekkel et al., 1996; Ruis et al., 1997; Hillmann et al., 2008), generalmente con valores más elevados por la mañana que por la tarde o por la noche. Además, los incrementos de edad y de peso pueden influir sobre las concentraciones de cortisol (Ruis et al., 1997; De Jong et al., 2000; Hillmann et al., 2008).

En consecuencia, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia del tipo de suelo de los corrales, en un alojamiento con enrejillado parcial, sobre la concentración de cortisol en saliva por la mañana y por la tarde de cerdos en cebo a dos pesos (y edades) diferentes.

2. Materiales y Métodos

2.1. Instalaciones

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Bienestar Porcino (LBP) de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid. El LBP cuenta con cuatro salas totalmente independientes para alojar los cerdos en cebo. Cada sala se compone de seis corrales o boxes. Los corrales tienen el suelo parcialmente enrejillado (60% de suelo continuo y 40% de suelo enrejillado) (Figura 1).

En la zona de suelo continuo se encuentra el comedero (tipo tolva holandesa), y en la zona de enrejillado, dos bebederos de cazoleta, aunque solo estuvo en uso el más próximo al comedero. Dos de las salas cuentan con suelo continuo de hormigón y enrejillado de hormigón (salas HH), y las otras dos, con suelo continuo recubierto de resina epoxídica y enrejillado metálico (salas RM) (Figuras 1, 2 y 3).

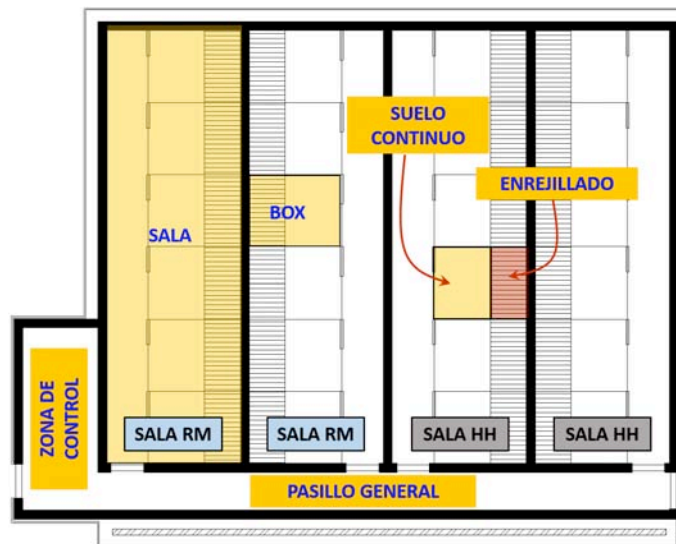


Figura 1. Croquis de las instalaciones de cebo del Laboratorio de Bienestar Porcino.

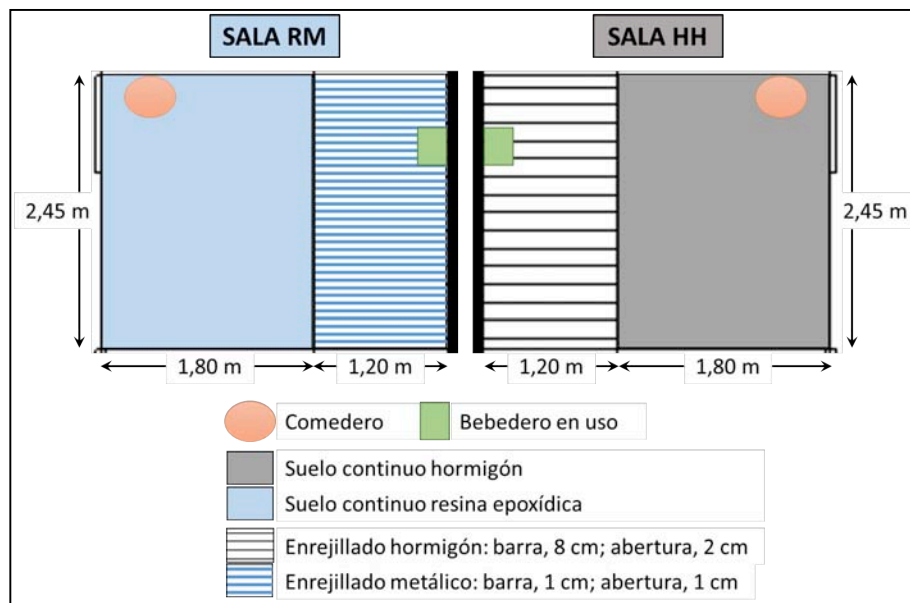


Figura 2. Croquis de los dos tipos de corrales: HH y RM.



Figura 3. a) Suelo continuo de hormigón, enrejado de hormigón (HH); b) suelo continuo recubierto de resina epoxídica, enrejado metálico (RM).

Todas las salas cuentan con un sistema de ventilación por extracción bajo suelo, con la posibilidad de refrigerar el aire de entrada mediante paneles de refrigeración evaporativa en caso necesario.

2.2. Animales

Se han utilizado 144 cerdos (72 machos enteros y 72 hembras) cruzados Piétrain x (Large White x Landrace), que llegaron al LBP con un peso vivo medio de 19,2 kg. En cada sala, los animales fueron distribuidos por sexos (3 corrales de machos y 3 de hembras, al azar), a razón de 6 cerdos/box (1,2 m²/cerdo). El cebo se prolongó durante 98 días, hasta que los cerdos alcanzaron un peso vivo medio de 111,9 kg.

Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con piensos comerciales presentados en gránulo. El acceso al agua fue libre en todo momento.

La temperatura media diaria durante el cebo fue de 24,9 ± 1,3 °C. La rutina de manejo de los animales fue la misma a lo largo de todo el periodo experimental.

2.3. Toma de muestras y análisis de laboratorio

La toma de muestras de saliva se realizó a tres distintas edades de los animales. La primera, para determinar los niveles iniciales de cortisol y tener en cuenta la variabilidad individual al analizar los datos correspondientes a las edades posteriores, se llevó a cabo a los 2,5 meses de edad (peso vivo medio, 30 kg).

Posteriormente, se tomaron muestras de saliva cuando los cerdos tuvieron 3,6 y 5,0 meses de edad (con pesos vivos medios aproximados de 60 y 100 kg, respectivamente). En la Tabla 1 se indican los pesos vivos de los animales, según el tipo de suelo, en los momentos de toma de muestras de saliva.

En los tres días de muestreo, se realizaron tomas de muestras por la mañana (10.30-12.00 h) y por la tarde (16.30-18.00 h) a todos los animales excepto a los diez que la rechazaron. En todos los muestreos se siguió el mismo orden de las salas, y en cada sala, de los corrales.

Tabla 1. Pesos vivos (media ± desviación típica) de los animales, en kg, según el tipo de suelo para cada momento del ensayo.

	Edad	
	3,6 meses	5,0 meses
Todos	60,5 ± 6,4	100,8 ± 8,2
Tipo de suelo ¹		
HH	59,5 ± 6,1	99,7 ± 8,2
RM	61,6 ± 6,6	101,9 ± 8,0

¹ HH: suelo continuo de hormigón + enrejillado de hormigón; RM: suelo continuo de resina epoxídica + enrejillado metálico.

El procedimiento consistió en introducir una torunda de algodón en la boca del cerdo. Cada torunda fue exclusiva para cada animal. Se les dejó chuparla y masticarla durante 20 segundos. Una vez se extrajeron las torundas de la boca de los cerdos, se introdujeron en viales con doble fondo perforado (Salivette®cortisol, SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania) y se centrifugaron durante 5 minutos a 2.500 rpm en una centrífuga portátil (EBA20 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania) para capturar la saliva en el fondo del vial (Figura 4). Las muestras así obtenidas se congelaron inmediatamente en hielo seco: desde la toma de la muestra hasta su total congelación en ningún caso se superaron los 30 minutos.

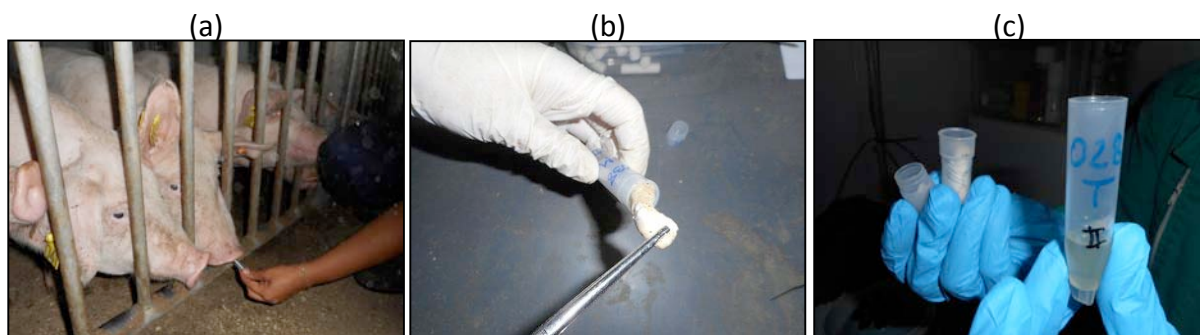


Figura 4. Procedimiento de toma de muestras de saliva: a) Animal impregnando de saliva la torunda de algodón. b) Introducción de la torunda en el vial para su posterior centrifugado. c) Muestra tras el centrifugado.

Los viales con las muestras de saliva congeladas se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis, que se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL (Hontalbilla, Segovia). Para la determinación de la concentración de cortisol se utilizó un kit ELISA de competición (Cortisol free in Saliva ELISA® DES6611, DEMEDITEC Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Alemania). La lectura de la absorbancia de los pocillos de las placas se llevó a cabo con un espectrofotómetro (Bio Tek ELx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Estados Unidos) a 450 nm .

2.4. Análisis estadísticos

El ensayo se ha diseñado como un experimento factorial, con estructura de *split-plot* (parcelas subdivididas); a las parcelas principales (salas) se les asignó el factor 'tipo de suelo', y a las parcelas secundarias (boxes), el factor 'sexo'.

Los datos de concentración de cortisol en saliva de las muestras tomadas mañana y tarde, cuando los animales tenían 3,6 y 5,0 meses de edad, se sometieron a análisis de covarianza según el modelo que incluía el 'tipo de suelo' y el 'sexo' como factores fijos, y el correspondiente (mañana o tarde, según el caso) nivel de cortisol a los 2,5 meses de edad (30 kg de peso vivo medio) como covariable, utilizando el procedimiento GLM del programa SAS (SAS Institute, 2002). Para cada factor, se utilizó el término de error adecuado.

Asimismo, se realizó una prueba *t* de medidas apareadas con las concentraciones de cortisol en saliva de mañana y de tarde para cada una de las edades de muestreo, utilizando el procedimiento UNIVARIATE del programa SAS (SAS Institute, 2002).

3. Resultados y Discusión

En esta comunicación se presentan los resultados correspondientes al factor 'tipo de suelo'.

Para todas las edades de muestreo, las concentraciones de cortisol en saliva de la mañana fueron significativamente distintas de las de la tarde: 2,5 meses de edad, $p < 0,0001$; 3,6 meses de edad, $p = 0,0046$; 5,0 meses de edad, $p = 0,0347$. Estos resultados son conformes con la existencia de un ritmo circadiano para los niveles de cortisol.

En la Tabla 2, aparecen los resultados correspondientes al momento en que los cerdos tenían 3,6 meses de edad y un peso vivo medio de, aproximadamente, 60 kg.

A los 3,6 meses, las concentraciones de cortisol en saliva de los cerdos alojados en el suelo RM fueron numéricamente mayores que las de los alojados en el suelo HH, tanto por la mañana como por la tarde, pero el efecto del tipo de suelo solo resultó significativo por la mañana, probablemente debido a la gran variabilidad de los datos de la tarde (véase el EEM, error estándar de la media). Para ambos tipos de suelo, los valores de cortisol en saliva fueron menores por la tarde que por la mañana, y el ritmo circadiano fue más marcado en el caso de los animales del suelo HH: en estos, el

valor medio de la tarde supuso el 80,6 % del de la mañana, mientras que en los del suelo RM, el 97,9%.

Tabla 2. Efectos del tipo de suelo sobre la concentración de cortisol en saliva¹ de los cerdos de 3,6 meses de edad (60 kg PV), en ng·mL⁻¹.

	N	Mañana	Tarde
Tipo de suelo ²			
HH	65	8,28	6,68
RM	69	8,85	8,67
EEM		0,025	0,669
<i>p</i>		0,0393	0,2789

¹ Son medias de mínimos cuadrados.

² HH: suelo continuo de hormigón + enrejillado de hormigón; RM: suelo continuo de resina epoxídica + enrejillado metálico.

N: número de observaciones.

p: probabilidad (análisis de covarianza).

EEM: error estándar de la media.

En la Tabla 3 están reflejados los resultados para el momento en que los cerdos tenían 5,0 meses de edad y un peso vivo medio de, aproximadamente, 100 kg.

Tabla 3. Efectos del tipo de suelo sobre la concentración de cortisol en saliva¹ de los cerdos de 5,0 meses de edad (100 kg PV), en ng·mL⁻¹.

	N	Mañana	Tarde
Tipo de suelo ²			
HH	65	7,86	8,87
RM	69	8,75	8,89
EEM		0,135	0,035
<i>p</i>		0,1323	0,7540

¹ Son medias de mínimos cuadrados.

² HH: suelo continuo de hormigón + enrejillado de hormigón; RM: suelo continuo de resina epoxídica + enrejillado metálico.

N: número de observaciones.

p: probabilidad (análisis de covarianza).

EEM: error estándar de la media.

Como a los 3,6 meses, a los 5,0 meses de edad, por la mañana y por la tarde, las concentraciones de cortisol en saliva de los cerdos alojados en el suelo RM fueron numéricamente mayores que las de los alojados en el suelo HH, pero en ningún caso las diferencias resultaron significativas. Contrariamente a lo observado a los 3,6 meses de edad, a los 5,0 meses los valores de cortisol en saliva fueron mayores por la tarde que por la mañana, aunque a esta última edad el ritmo circadiano también fue más acusado en el caso del suelo HH: para los cerdos alojados en este tipo de suelo, el valor medio de la tarde supuso el 112,8 % del de la mañana, mientras que para los alojados en el suelo RM, el 101,6 %.

Por otra parte, en ambos tipos de suelo, al aumentar la edad (y peso) de los animales, se produjo un incremento tanto del contenido en cortisol más elevado (el de la mañana a los 3,6 meses de edad y el de la tarde a los 5,0 meses) como del más bajo (el de la tarde a los 3,6 meses de edad y el de la mañana a los 5,0 meses).

El incremento del contenido en cortisol observado al aumentar la edad de 3,6 meses (aproximadamente, 15 semanas) a 5,0 meses (21 semanas) coincide en gran medida con lo

observado por Evans et al. (1988), en cerdas Yorkshire x Landrace, quienes encontraron niveles de cortisol en sangre mayores a las 12 y 24 semanas de edad que a las 16 y 20 semanas, y por Hillmann et al. (2008) en hembras y machos castrados entre 60 y 100 kg de peso vivo; no coincide, sin embargo con lo observado por Ruis et al. (1997), trabajando con hembras y machos castrados Great Yorkshire x (Great Yorkshire x Landrace), quienes señalan una disminución de la concentración basal de cortisol en saliva entre las 12 y las 24 semanas de edad, ni con la reducción gradual de dicha concentración entre las 15 y las 22 semanas apuntada por De Jong et al. (2000) utilizando también hembras y machos castrados Great Yorkshire x (Great Yorkshire x Landrace). Posiblemente, diferencias entre géneros (machos enteros, machos castrados, hembras) y entre tipos genéticos para el desarrollo del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal puedan estar relacionadas con esta disparidad de resultados observados.

En nuestro trabajo, los niveles de cortisol en saliva fueron mayores por la mañana que por la tarde cuando los cerdos tenían 3,6 meses de edad (60 kg de peso vivo) y sucedió lo contrario cuando tenían 5,0 meses (100 kg PV). En otros estudios, el ritmo circadiano de los niveles basales de las concentraciones de cortisol en sangre y saliva conlleva generalmente valores más elevados por la mañana que por la tarde o por la noche (Evans et al., 1988; Ekkel et al., 1996); algunos autores observan incluso dos picos diarios de cortisol (De Leeuw y Ekkel, 2004; Hillmann et al., 2008), posiblemente debido a aplicar alimentación restringida con dos suministros de alimento al día. No obstante, los datos del trabajo de Ruis et al. (1997) apuntan a un retraso del pico de cortisol del ritmo circadiano al aumentar la edad de los animales, y Hillmann et al. (2008) señalan que los dos picos diarios que observaron ocurrieron a las 12.00 y a las 05.00 h cuando los cerdos pesaban 60 kg, entre las 12.00 y las 15.00 h y entre las 06.00 y las 09.00 cuando pesaban 80 kg, y a las 16.00 y a las 06.00 h cuando alcanzaron los 100 kg. Nuestros resultados parecen confirmar la tendencia al retraso, con el aumento de la edad de los animales, del pico de cortisol del ritmo circadiano que se desprende de los trabajos de Ruis et al. (1997) y Hillmann et al. (2008).

En nuestro estudio, a los 3,6 y a los 5,0 meses de edad (60 y 100 kg PV, respectivamente), los cerdos alojados en los corrales con suelo RM tuvieron concentraciones de cortisol en saliva numéricamente mayores que los alojados en el suelo HH, tanto por la mañana como por la tarde, si bien no siempre las diferencias fueron significativas; además, las variaciones de los niveles de cortisol entre mañana y tarde fueron más marcadas en el caso de los animales alojados en el suelo HH que en el de los alojados en el suelo RM. Si tenemos en cuenta que los niveles basales de cortisol en saliva más elevados van asociados con situaciones de estrés crónico (De Jonge et al., 1996; Wiepkema y Koolhaas, 1993) y que a menudo se han registrado ritmos circadianos más aplanados en dichas situaciones (De Jong et al., 2000), parece deducirse que, en las condiciones de nuestro trabajo (cebo en suelo con enrejillado parcial), el suelo RM fue más estresante para los animales que el suelo HH, probablemente porque un acabado impermeable del suelo continuo y un enrejillado metálico resultaron más resbaladizos que un suelo continuo poroso y un enrejillado de hormigón.

4. Conclusiones

En cebo sobre suelo parcialmente enrejillado, el acabado impermeable (resina epoxídica) del suelo continuo y el enrejillado metálico parecen más estresantes para los cerdos que el suelo continuo de hormigón y el enrejillado de hormigón.

Por otro lado, la evolución con la edad de los animales de su ritmo circadiano para el cortisol en saliva y la influencia de las situaciones estresantes sobre la forma de dicho ritmo hacen aconsejables los muestreos de saliva mañana y tarde para evaluar adecuadamente el estrés crónico sufrido por los cerdos.

Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias al proyecto INIA con código RTA2013-00090-C02-02.

Bibliografía

- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P. and Morgan Jones, S. 1996. Salivary vs serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 329-335.
- De Jong, I. C., Ekkel, E. D., Van De Burgwal, J. A., Lambooi, E., Korte, S. M., Ruis, M. A. W., Koolhaas, J. M. and H. J. Blokhuis. 1998. Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs. *Physiology & Behavior* 64(3): 303-310.
- De Jong, I.C., Prelle, I.T., Van de Burgwal, J.A., Lambooi, E., Mechiel Korte, S., Blokhuis, H.J. and 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 & Behavior* 68: 571-578.
- De Jonge, F.H., Bokkers, E.A.M.; Schouten, W.G.P. and Helmond, F.A. 1996. Rearing piglets in a poor environment: developmental aspects of social stress in pigs. *Physiology & Behavior* 60: 389-396.
- De Leeuw, J.A. and Ekkel, E.D. 2004. Effects of feeding level and the presence of a foraging substrate on the behaviour and stress physiological response of individually housed gilts. *Applied Animal Behaviour Science* 86: 15-25.
- Ekkel, E. D., Dieleman, S. J., Schouten, W. G. P., Portela, A., Cornélissen, G., Tielen, M. J. M. and Halberg, F. 1996. The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60(3) 985-989.
- Evans, F. D., Christopherson, R. J., and Aherne, F. X. 1988. Development of the circadian rhythm of cortisol in the gilt from weaning until puberty. *Canadian Journal of Animal Science* 68: 1105-1111.
- Hillmann, E., Schrader, L., Mayer, C. and Gyax, L. 2008. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal* 2_3: 405-409.
- Marin, A., Pozza, G., Candotti, P., Pasotto, M., Marisilo, E., Ragno, E., Rota Nodari, S. and Ravarotto, L. 2005. Determinazione del cortisolo salivare in suini sottoposti a tre diverse tipologie di pavimentazione con l'utilizzo di un sistema analitico in chemiluminiscenza. *Large Animals Review*, Anno 11, 3: 31-36.
- Merlot, E., Thomas, F., Mounier, A.M., Dourmad, J.Y., Lebret, B. and Prunier, A. 2010. Influence de la race et du mode de logement sur la sécrétion de cortisol, l'immunité et la santé des porcs à l'engrais. *Journées Recherche Porcine CE4*: 21-26
- Nyberg, L., Lundstrom, K., Edfors-Lilja, I. and Rundren, M. 1988. Effects of transport stress on concentrations of cortisol, corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid receptors in pigs with different halothane genotypes. *Journal of Animal Science* 66: 1201-1211.
- Ruis, M. A. W., Te Brake, J. H. A., Engel, B., Ekkel, E. D., Buist, W. G., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M. 1997. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology & Behavior* 62(3): 623-630.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT® User's Guide, version 9. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Wiepkema, P.R. and Koolhaas, J.M. 1993. Stress and animal welfare. *Animal Welfare*. 2: 195-218.