



Effect of environmental enrichment on performance of piglets during anxiety tests

Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el desempeño de lechones en pruebas de ansiedad

Espejo-Beristain, G., Paredes-Ramos, P., Ahuja-Aguirre, C., Carrasco-García, A. A., Naranjo-Chacón, F.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Miguel Ángel de Quevedo s/n esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, C.P. 91710, Veracruz, Ver., México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Espejo-Beristain, G., Paredes-Ramos, P., Ahuja-Aguirre, C., Carrasco-García, A. A., Naranjo-Chacón, F. (2020). Effect of environmental enrichment on performance of piglets during anxiety tests. *Revista Bio Ciencias* 7, e789. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e789>



ABSTRACT

Studies in rodents suggested that environmental enrichment can improve the ability of animals to cope with stressful situations. In this study, the effect of environmental enrichment was evaluated on the behavioral response of piglets in anxiety tests. The study included 2 experiments, in the first one, 20 piglets from mothers who received enrichment and 20 from control sows were selected. Mothers of animals from the group with enrichment received stimulation during pregnancy and posteriorly piglets for 21 days. On post-natal day 22, animals were exposed to a novel object test and the day after to an elevated plus maze. Results showed that pigs with enrichment showed a lower number of escape attempts, and a greater latency to vocalizations. Likewise, control pigs performed fewer

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 9th 2019.

Accepted/Aceptado: April 6th 2020.

Available on line/Publicado: April 22th 2020.

RESUMEN

Estudios en roedores sugieren que el enriquecimiento ambiental puede mejorar la capacidad de los animales para hacerle frente a situaciones estresantes. En este estudio evaluamos el efecto del enriquecimiento ambiental sobre el comportamiento de lechones en pruebas de ansiedad. El estudio incluyó 2 experimentos, en el primero seleccionamos 20 lechones de madres que recibieron enriquecimiento y 20 de cerdas control. Las madres de los animales del grupo con enriquecimiento recibieron estimulación durante la gestación y posteriormente los lechones durante 21 días. El día posnatal 22 los animales fueron expuestos a la prueba de objeto nuevo y el siguiente al laberinto de cruz elevada. Los resultados mostraron que los cerdos con enriquecimiento mostraron un menor número de intentos de escape, y mayor latencia a las vocalizaciones. Asimismo, los cerdos control realizaron menos intentos de entrada a los brazos abiertos y de evaluación de riesgos. En el segundo experimento 60 lechones fueron divididos en 4 grupos: 1) recibió enriquecimiento durante

*Corresponding Author:

Pedro Paredes Ramos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Miguel Ángel de Quevedo s/n esq. Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, Veracruz, Ver., México. C.P. 91710. E-mail: pparedes@uv.mx.

attempts to enter into open arms and risk assessment. In the second experiment, 60 piglets were divided into 4 groups: 1) received enrichment during pregnancy-lactation, 2) enrichment during weaning, 3) enrichment during pregnancy-lactation-weaning and 4) without enrichment. On post-natal day 70, pigs were exposed to an elevated plus maze. Results showed that pigs from group 1 showed less anxiety during the test compared with groups 3 and 4. This suggested that environmental enrichment during pregnancy-lactation positively impacted the ability of piglets to regulate anxiety.

KEY WORDS

Pigs, emotions, animal welfare, ethology.

Introduction

The World Organization for Animal Health (OIE), which has more than 150 member countries, considers that an animal presents welfare when it is healthy, comfortable, well fed, safe, is able to express its behavior, and does not suffer unpleasant states, such as pain, fear and anxiety (OIE, 2008). Unfortunately, the intensive production of animals for human benefit has reduced farms' ability to provide animal welfare (AW). In the particular case of pigs, the high demand for the consumption of their meat generated an increase in their production and in the way they are housed during their production chain (USDA-FAS, 2019). In farms with semi-intensive and intensive management systems, pigs are constantly exposed to aversive events such as aggressive handling by farm workers (Tallet *et al.*, 2018), early weaning (Siegford *et al.*, 2008), formation of new groups or mix of animals of different ages (Colson *et al.*, 2012), (Verdon *et al.*, 2016), exposure to extreme temperatures (Parker *et al.*, 2010), and housing with little or no social and sensorial stimulation (Merlot *et al.*, 2012; Brajon *et al.*, 2017). Studies indicate that this type of conditions generates stress in animals and, as a consequence, a poor welfare.

One of the serious problems of stress, understood as a response to a real or perceived threat altering the homeostasis of an organism (McEwen, 2000), is that it could have severe negative effects if it occurs in a

gestación-lactación, 2) enriquecimiento durante destete, 3) enriquecimiento durante gestación-lactación-destete y 4) sin enriquecimiento. El día posnatal 70, los cerdos fueron expuestos al laberinto de cruz elevada. Los resultados mostraron que los cerdos del grupo 1 mostraron menos ansiedad durante la prueba comparado con los del grupo 3 y 4. Esto sugiere que el enriquecimiento ambiental durante la gestación-lactación impacta positivamente la capacidad de los cerdos para regular la ansiedad.

PALABRAS CLAVE

Cerdos, emociones, bienestar animal, etología.

Introducción

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), que cuenta con más de 150 países miembros, considera que un animal está en bienestar cuando éste está sano, cómodo, bien alimentado, seguro, es capaz de expresar su comportamiento y no sufre estados desagradables como el dolor, miedo y angustia (OIE, 2008). Desafortunadamente, la producción intensiva de animales para beneficio de los humanos ha mermado la capacidad de las unidades de producción para proveer bienestar animal (AW). En el caso particular del cerdo, la alta demanda en el consumo de su carne ha generado un incremento en su producción y en la forma en la que estos son alojados durante su cadena productiva (USDA-FAS, 2019). En granjas con sistemas de manejo semi-intensivo e intensivo, los cerdos son constantemente expuestos a eventos aversivos como el manejo agresivo por parte de los trabajadores (Tallet *et al.*, 2018), destete precoz (Siegford *et al.*, 2008), la formación de nuevos grupos o mezcla de animales de diferentes edades (Colson *et al.*, 2012), (Verdon *et al.*, 2016), exposición a temperaturas extremas (Parker *et al.*, 2010), y alojamientos con poca o nula estimulación social y sensorial (Merlot *et al.*, 2012; Brajon *et al.*, 2017). Estudios indican que este tipo de condiciones genera estrés en los animales y como consecuencia un pobre bienestar.

Uno de los graves problemas del estrés, entendido como una respuesta ante una amenaza real o percibida que altera la homeostasis de un organismo, (McEwen, 2000), es que si ocurre de manera prolongada o continua pueden tener graves efectos negativos. Algunos de los efectos

prolonged or continuous way. Some of the physiological effects of stress include deficiencies in the immune system and the activation of the hypothalamo-hypophysis-adrenal (HPA) axis. While experiencing acute stress is an adaptive response with which an organism improves its capacity to face its environment and survive. Constant stress, prolonged or chronic, has negative effects on vital biological functions, such as reproduction, immune response and growth, mainly due to the quantity of glucocorticoids and catecholamines released in the system (Moberg, 2000).

In farms, stress negatively affects the exploitation of the animals since it reduces their health, causes a low productive yield (McLamb *et al.*, 2013) (Dong and Pluske, 2007), alters their growth rates (Hyun *et al.*, 1998), increases mortality rates (Edwards, 2002) and increases the incidence of undesirable behaviors (Manteuffel *et al.*, 2004; Valros, 2018) (Holinger *et al.*, 2018). A strategy that seems to mitigate the negative effects of stress and to increase AW, is the environmental enrichment (EE). Generally, it is defined as the environmental modification of captivity conditions, leading to an improvement in the biological performance of the animals (Ruth C. Newberry, 1995). One of the main objectives of the EE is to improve the way the animals face novelty and stress (Shepherdson, 1989). There are diverse types of EE, for instance social EE, including animal-animal and human-animal interactions, occupational EE, physical EE, involving the quality and quantity of available space, and sensorial EE, implying senses stimulation (Young, 2013). Studies in pigs indicate that EE increases the incidence of behaviors typical from the species, such as exploratory behavior (Yang *et al.*, 2018) and playing behavior (Martin *et al.*, 2015), while it decreases negative states such as aggressiveness (Marcet-Rius *et al.*, 2019) and pre-natal stress (Brajon *et al.*, 2017), in addition to fostering learning abilities (Jansen *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2012).

Studies suggest that one of the main benefits of EE is that it helps animals to properly manage their emotions by making them more skillful to face stressful situations (Panksepp, 2004). In animals, emotions can be assessed by means of physiological and behavioral indicators, being these last ones the most practical. Considering that behavior evolved from basic skills allowing animals to survive, avoiding danger and searching for resources (Panksepp, 1982; Paul y Mendl, 2018). Emotions can

fisiológicos del estrés incluyen deficiencias en el sistema inmune y la activación del eje eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). Mientras que experimentar estrés de forma aguda es una respuesta adaptativa con la que el organismo mejora su capacidad para hacer frente a su entorno y sobrevivir. El estrés constante, prolongado o crónico tiene efectos negativos en funciones biológicas vitales como la reproducción, la respuesta inmune, y el crecimiento, esto debido principalmente a la cantidad de glucocorticoides y catecolaminas liberadas en el sistema (Moberg, 2000).

En las unidades de producción, el estrés impacta negativamente el aprovechamiento de los animales ya que merma su salud, provoca un bajo rendimiento productivo (McLamb *et al.*, 2013) (Dong & Pluske, 2007), altera sus tasas de crecimiento (Hyun *et al.*, 1998), incrementa las tasas de mortalidad (Edwards, 2002) e incrementa la aparición de comportamientos indeseados (Manteuffel *et al.*, 2004; Valros, 2018) (Holinger *et al.*, 2018). Una estrategia que parece mitigar los efectos negativos del estrés y aumentar el AW, es el enriquecimiento ambiental (EE). En general, éste se define como la modificación ambiental del cautiverio, lo que conduce a una mejora en el funcionamiento biológico de los animales (Ruth C. Newberry, 1995). Uno de los principales objetivos del EE es lograr que los animales mejoren la forma en que hacen frente a la novedad y estrés (Shepherdson, 1989). Existen diversos tipos de EE, por ejemplo el social, que incluye interacciones animal-animal y humano-animal, el ocupacional, el físico, que involucra la calidad y cantidad de espacio disponible, y el sensorial que implica la estimulación de los sentidos (Young, 2013). Estudios en el cerdo indican que el EE incrementa la aparición de comportamientos propios de su especie como el exploratorio (Yang *et al.*, 2018) y de juego (Martin *et al.*, 2015), mientras que disminuye estados negativos como la agresividad (Marcet-Rius *et al.*, 2019) y el estrés prenatal (Brajon *et al.*, 2017), además de favorecer habilidades de aprendizaje (Jansen *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2012).

Estudios sugieren que uno de los principales beneficios del EE, es que ayuda a los animales a gestionar adecuadamente sus emociones haciéndolos más hábiles para hacer frente a situaciones estresantes (Panksepp, 2004). En los animales, las emociones pueden ser evaluadas mediante indicadores fisiológicos y conductuales, siendo estos últimos los más prácticos para hacerlo. Tomando en cuenta que el comportamiento evolucionó a partir de habilidades básicas que permitieron a los animales sobrevivir, evitando el peligro y buscando recursos (Panksepp, 1982; Paul & Mendl, 2018). Es posible evaluar emociones a través del uso de paradigmas

be assessed by using behavioral paradigms, where individual behavior is registered and associated to emotional states, such as fear, anxiety, exploration and locomotion in a great number of animals, including pigs (Andersen *et al.*, 2000; Wemelsfelder *et al.*, 2000; Siegford *et al.*, 2008; Donald *et al.*, 2011; Rutherford *et al.*, 2012; Tönepöhl *et al.*, 2012).

Since pigs represent a relevant food source worldwide, it seems important to improve the knowledge on their basic emotional requirements and on the strategies driving the establishment of programs improving their welfare. Therefore, the present study evaluates the effect of EE on the capacity of pigs to respond to anxiety tests.

Material and Methods

Location and ethics

The study was performed in a semi-intensive pig meat farm located in the municipality of Emiliano Zapata, state of Veracruz, Mexico (19° 41' N, 96° 56' W), with an altitude of 165 meters above sea level, annual average temperature of 25.2 °C and annual precipitation of 2700 mm (García, 1988).

The use of animals and the procedures to which animals were submitted during the study were approved by the Commission of Bioethics and Animal Welfare of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of the University of Veracruz.

Experiment 1. Effect of EE on piglets performance in novel object test and elevated plus maze

Animals

20 F1 sows (Yorkshire/Landrace) with 3 to 4 parturitions were selected, and a score of 3.5–4 for body condition in a scale of 5 points (1=thin and 5=obese) (Gadd, 2011), whose offspring were used. Sows were randomly divided into a treatment group (n = 10) and a control group (n=10). From 7 to 15 weeks of pregnancy, sows were housed in individual cages of 2.5 m in length and 0.80 m in width, equipped with a water dispenser, a semiautomatic eating trough and grooved cement floor. Posteriorly, from 15 to 19 weeks of pregnancy, sows were housed in cages of 2.5 m in length and 1.2 m in width, each one equipped with a classic eating trough,

conductuales, donde se registra el comportamiento de los individuos y se asocian con estados emocionales como el miedo, ansiedad, exploración y locomoción en un gran número de animales incluidos el cerdo (Andersen *et al.*, 2000; Wemelsfelder *et al.*, 2000; Siegford *et al.*, 2008; Donald *et al.*, 2011; Rutherford *et al.*, 2012; Tönepöhl *et al.*, 2012).

Dada la relevancia del cerdo como fuente de alimento alrededor del mundo, parece importante mejorar nuestro conocimiento sobre sus necesidades básicas emocionales y sobre las estrategias que impulsen la implementación de programas que mejoren su bienestar. Por todo ello, en el presente estudio evaluamos el efecto del EE sobre la capacidad de los cerdos para responder a pruebas de ansiedad.

Material y Métodos

Ubicación y ética

El estudio se realizó en una unidad de producción porcícola semi-intensiva ubicada en el municipio de Emiliano Zapata, estado de Veracruz, México (19° 41' N, 96° 56' O), con una altitud de 165 metros sobre el nivel del mar, temperatura media anual de 25.2 °C y precipitación anual de 2700 mm (García, 1988).

El uso de animales y los procedimientos a los que fueron sometidos los animales durante el estudio fueron aprobados por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.

Experimento 1. Efecto del EE de lechones sobre su desempeño en pruebas de objeto nuevo y laberinto de cruz elevada.

Animales

Se seleccionaron 20 cerdas F1 (Yorkshire/Landrace) con 3 a 4 partos, y una condición corporal de 3.5-4 en escala de 5 puntos (1=delgada y 5=obesa) (Gadd, 2011), de los cuales utilizamos sus crías. Las cerdas fueron divididas al azar en grupo tratamiento (n=10) y grupo control (n=10). De la semana 7 a la 15 de gestación, las cerdas fueron alojadas en jaulas individuales de 2.5 m de largo por 0.80 m de ancho, equipadas con un bebedero, un comedero semiautomático y piso de cemento ranurado. Posteriormente, de la semana 15 y hasta la semana 19, las cerdas fueron alojadas en jaulas de 2.5 m de largo por 1.2 m de ancho, cada una equipada con

water dispenser and raised grid floor of 1 m high. In the front part, the cages had a wooden pig breeding center to provide refuge and heat to the offspring by means of an electric heater. Food for the pregnant sows consisted in a daily portion of 1.5 kg of feed concentrate (soy, sorghum or corn, vitamins, minerals and some additives) provided in one dose, while sows in maternity were provided with 7 to 10 kg of food daily, divided into four portions. On the other hand, food for the offspring consisted in breastmilk *ad libitum* plus 100 mL of pre-initiator feed (Apligain pig, Apligén®), given from the second week of life and until weaning.

Environmental enrichment for pregnant sows

The occupational enrichments used for the sows during pregnancy were the following:

Homemade food dispenser: 4-inch polyvinyl chloride (PVC) tubes of 50 cm in length, with 16 holes of approximately 1 cm in diameter, distributed to its full extent, with lids at both ends. The tube was placed horizontally, fastened at the front of the cage, acting as a roller, which the sows could make spin around to obtain 100 g of pre-initiator feed for offspring, and which was placed before each EE.

Rope: Three segments of polypropylene-polyester plaited rope of 20 cm in length and 6 mm in diameter were used, fastened to the cage.

Plastic tube: It consisted in 3 segments of hose of 30 cm in length and 1 inch in diameter, united to a cotton rope of 40 cm in length allowing to fasten it to the cage.

Straw: 300g of straw from Pangola-grass (*Digitaria decumbens*) was provided, cut into 5 cm in length approximately and placed in the trough of each sow.

Straw bed: Straw of 20 cm in length was provided, distributed on all the floor of the cage, making a bed of 1-2 cm thick.

Fresh coconut shell: Freshly cut coconuts were used, halved and drilled, a rope of 40 cm in length was introduced through the hole to hang it in the cage.

Massages: A tactile stimulation was provided on the back and laterals of the sows using a waterproofing

comedero clásico, bebedero y piso de rejilla elevada con una altura de 1 m. En la parte frontal, las jaulas contaron con una lechonera de madera para proporcionarle refugio y calor a las crías mediante un calentador eléctrico. La alimentación de las cerdas en gestación consistió en una ración diaria de 1.5 kg de alimento concentrado (soya, sorgo o maíz, vitaminas, minerales y algunos aditivos) proporcionado en una toma, mientras que en maternidad se les proporcionó de 7 a 10 kg por día dividido en cuatro raciones. Por su parte, la alimentación de las crías consistió en leche materna *ad libitum* más 100 mL de alimento pre iniciador (Apligain pig, Apligén®), ofrecido a partir de la segunda semana de vida y hasta el destete.

Enriquecimiento ambiental para cerdas gestantes

Los enriquecimientos ocupacionales utilizados para las cerdas durante gestación fueron los siguientes:

Dispositivo casero de alimentación: tubo de policloruro de vinilo (PVC) de 4 pulgadas de 50 cm de longitud, con 16 agujeros de aproximadamente 1 cm de diámetro repartidos en toda su extensión, con tapas en ambos extremos. El tubo se colocó horizontalmente sujeto al frente de la jaula, este actuaba como un rodillo el cual las cerdas podían hacer girar para obtener 100 g de alimento pre-iniciador para lechones que se colocaba antes de cada EE.

Soga: Utilizamos tres segmentos de 20 cm de longitud de cuerda de polipropileno-poliéster de 6 mm de diámetro trenzado sujeta a la jaula.

Tubo de plástico: Consistió en 3 segmentos de 30 cm de manguera de 1 pulgada, unido a una soga de 40 cm de algodón mediante el cual fue sujeta a la jaula.

Paja: Se proporcionaron 300 g de paja de pasto pangola (*Digitaria decumbens*), cortado en 5 cm de longitud aproximadamente y colocado en el comedero de cada cerda.

Cama de paja: Se proporcionó paja de 20 cm de longitud, distribuida por todo el piso de la jaula formando una cama de 1-2 cm de espesor.

Cascara de coco fresca: Se utilizaron coco recién cortados a los que se les partió por mitad y se le hizo un agujero por el que se pasó una cuerda de 40 cm con la se colgó en la jaula.

Masajes: Se proporcionó estimulación táctil sobre el dorso y laterales de las cerdas utilizando un rodillo para

roller covered with synthetic grass (BYP®), multi-purpose work gloves (Skin-dex®), or floor scrub brushes (Thermotek®).

Exposure of sow to EE

The sows from the treatment group were exposed for 9 weeks to one of the different types of enrichment, both occupational and sensorial, while the sows from the control group were not submitted to any type of enrichment. While the occupational stimuli were provided for 30 minutes each, the sensorial ones were provided for 5 minutes with intervals of 1 minute of stimulation and 1 minute of rest, with a movement pattern from top to bottom (from head to tail). Every day, the sows were exposed to one of the different types of stimuli, on a schedule from 9 a.m. to 12 p.m. and performed by the same person.

EE for piglets

The enrichment provided to the piglets consisted in:

Massage: with a multi-purpose work glove (Skin-dex®) or with a floor scrub brush (Reynera®).

Ball: five unfilled plastic balls (payaso®) of approximately 5-10 cm in diameter were used as a toy for children and placed on the floor of the cages.

Plastic tube: segments of industrial hose of 15 cm in length and ½ inch in diameter were placed in the cage, fastened by means of a segment of rope of 40 cm in length as a pendant.

Rope: similar to the one used for the sows.

Wood: wooden segments of 20 cm in length x 5 cm in width, joined together forming a star shape, fastened with a rope of 40 cm in length.

Exposure of piglets to EE

After birth, 2 piglets of each sow from the treatment group were exposed for 21 days to the different types of enrichment mentioned in the previous section. The massages were provided during the first week of life of the piglets, for 30 seconds daily, with a movement pattern from top to bottom (from head to tail) with an approximate duration of 1 second per movement. On the other hand, the occupational stimuli were provided one per day, for 30 minutes, during the second and third week of life. The piglets were exposed

impermeabilizar forrado con pasto sintético (BYP®), guante de trabajo multiusos (Skin-dex®), o un cepillo de limpieza de pisos de uso rudo (Thermotek®).

Exposición al EE

Las cerdas del grupo tratamiento, fueron expuestas durante 9 semanas a uno de los diferentes tipos de enriquecimientos tanto ocupacional como sensorial, mientras que el grupo control no tuvo acceso a ningún tipo de enriquecimiento. Mientras que los estímulos ocupacionales fueron ofrecidos durante 30 minutos cada uno, los estímulos sensoriales fueron brindados durante 5 minutos con intervalos de 1 min de estimulación y un minuto de descanso, con un patrón de movimientos de arriba hacia abajo (de cabeza hacia cola). Cada día, las cerdas fueron expuestas a uno de los diferentes tipos de estímulos, en un horario de 9 am a 12 pm y realizados por la misma persona.

Enriquecimiento para los lechones

El enriquecimiento proporcionado a los lechones consistió en:

Masaje: con un guante multiusos (Skin-dex®) o con un cepillo de uso doméstico (Reynera®).

Pelota: se utilizaron cinco pelotas de plástico sin relleno (payaso®), de un diámetro aproximado desde 5-10 cm, utilizado como juguete para niños y colocadas en el piso de las jaulas.

Tubo de plástico: colocamos segmentos de 15 cm de manguera industrial de ½ pulgada de grosor, unidos mediante un segmento de soga de 40 cm de longitud formando un colgante.

Soga: similar a la utilizada en las cerdas.

Madera: segmentos de madera de 20 cm de largo x 5 cm de ancho, unidos en forma de estrella, sujetado con una soga de 40 cm de longitud.

Exposición de los lechones al EE

Ocurrido el parto, 2 lechones de cada cerda del grupo tratamiento fueron expuestos durante 21 días a los diferentes tipos de enriquecimiento mencionados en el apartado anterior. Los masajes fueron brindados en la primera semana de vida de los lechones, durante 30 segundos diariamente, con un patrón de movimientos de arriba hacia abajo (de cabeza hacia cola) con una duración aproximada de 1 segundo por movimiento. Por otra parte,

to one of the different types of stimuli, on a schedule from 9 a.m. to 11 a.m. The piglets of the sows from the control group were not submitted to any additional stimulation except the one provided during the typical handling of the farm.

Exposure to behavioral tests

On post-natal day 22, the piglets were exposed to the novel object (NO) test and on day 23 to the elevated plus maze (EPM) test.

Novel object test

NO test is used to assess fear or anxiety responses to the lack of familiarity with the performed stimuli (Boissy, 1995). Animals suffer a conflict between their motivation to explore and the avoidance when they are faced to a novel object (Adaptado de Tönepöhl *et al.*, 2012).

In the present study, each pig was individually exposed and placed inside a wooden quadrangular crate of 2 x 2 x 1 meters, with a door of 0.80 x 0.80 in one of its sides, floor covered with wood with a sketch of 9 squares of 66.6 x 66.6 cm. Previous to the entry of each pig, a donkey-shaped inflatable toy for children of 0.60 x 0.50 cm was placed in the crate (novel object). Each pig was free of moving on the arena for 10 minutes. The number of squares crossed, latency of first NO exploration, frequency of NO exploration, duration of NO exploration, latency of first escape attempt, frequency of escape attempt (when the animal tries to leave the test, jumping over the walls of the arena), latency of first vocalizations, frequency of vocalizations, latency of first urination, frequency of urination, latency of first defecation and frequency of defecation were registered.

Elevated plus maze test

A cross-shaped elevated plus maze (EPM) was used, based on the one described by Andersen *et al.*, (2000). This paradigm has been widely used in rodents to evaluate the anxiolytic properties of determined stimuli and medications, and recently it has been used in other species such as pig for the same purpose. The EPM was made of four arms, two opposed open arms without walls (125 x 0.50 cm) and two closed arms with walls (125 x 0.50 x 0.50 cm³) united by a central platform (0.50 x 0.50 cm²). The device was raised at 1 m height over the concrete floor of the test corral. Each pig was placed individually in the middle of the device for a period of 5

los estímulos ocupacionales fueron ofrecidos uno por día, durante 30 minutos, durante la segunda y tercera semana de vida. Los lechones fueron expuestos a uno de los diferentes tipos de estímulos, en un horario de 9 am a 11 am. Los lechones de las cerdas control no recibieron ningún tipo de estimulación adicional a los que reciben en el manejo típico de la granja.

Exposición a pruebas de comportamiento

El día postnatal 22, los lechones fueron expuestos a la prueba de objeto nuevo (NO) y el día 23 a la prueba de laberinto de cruz elevada (EPM).

Prueba de objeto nuevo

La prueba de NO, es una prueba utilizada para evaluar las respuestas de miedo o ansiedad a la falta de familiaridad de los estímulos expuestos (Boissy, 1995). Los animales sufren un conflicto entre su motivación para explorar y la evitación cuando se enfrentan a un objeto desconocido. (Adaptado de Tönepöhl *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, cada cerdo fue expuesto y colocado individualmente dentro de un cajón de madera cuadrangular de 2 x 2 x 1 metros, con una puerta de 0.80 x 0.80 en uno de sus lados, piso recubierto de madera con un trazado de 9 cuadrantes de 66.6 x 66.6 cm. Previo al ingreso de cada cerdo se colocó un juguete inflable para niños con forma de burro de 0.60 x 0.50 cm (NO). Cada cerdo fue libre de moverse por la arena durante 10 minutos. Se registró el número de cuadrantes recorridos, latencia de exploración del NO, la frecuencia de exploración del NO, duración de exploración del NO, latencia de intento de escape, frecuencia de intento de escape (cuando el animal intenta abandonar la prueba, saltando sobre las paredes de la arena), latencia de vocalizaciones, frecuencia de vocalizaciones, latencia de micción, frecuencia de micción, latencia de defecación y frecuencia de defecación.

Prueba de laberinto de cruz elevada

Utilizamos un laberinto elevado en forma de cruz, basándonos en el descrito por Andersen *et al.*, (2000). Este paradigma ha sido ampliamente utilizado en roedores para evaluar las propiedades ansiolíticas de determinados estímulos y fármacos, y recientemente ha sido utilizado en otras especies como el cerdo con el mismo fin. El EPM está compuesto por cuatro brazos, dos brazos opuestos abiertos sin paredes (125 x 0.50 cm) y dos brazos cerrados con paredes (125 x 0.50 x 0.50 cm³) unidos por una plataforma central (0.50 x 0.50 cm²). El aparato se elevó a una altura de 1 m sobre el piso de concreto del corral de prueba. Cada cerdo fue colocado de manera individual en el centro del aparato por un periodo

minutes. The frequency, latency and duration on open and closed arms, frequency and latency of attempts of entry into open and closed arms were registered, as well as the frequency and latency of risk assessment (number of times the animal attempts to leave the test, placing itself in a posture of jump attempt). If the animal leaves the ring, its assessment terminated.

Experiment 2: Effect of EE in different developmental stages of piglets on their performance in elevated plus maze test

Experimental animals and handling

Sixty piglets were selected from the day of their birth and were divided into four groups: animals from group 1 were offspring from sows who were provided with EE from day 70 of pregnancy (pregnancy), and who were later provided with EE during the 21 days after the birth (lactation). On the other hand, group 2 were piglets who were provided with EE during their weaning (Post-natal days 22 to 70), those from group 3 were provided with EE during pregnancy-lactation-weaning and those from group 4 were animals who were never provided with EE.

During lactation, piglets were housed with their mothers in the maternity area. During weaning, piglets were separated from the mother and housed in groups of 15 in corrals of 3.5 m in length and 2 m in width, equipped with two water dispensers, a semi-automatic trough and raised grid floor and cement lower floor with a slope where they were fed with commercial feed concentrate according to the developmental stage (pre-initiator, step 1, step 2 and step 3), at the rate of 1.2 to 1.7 kg/head/day.

Exposure to EE

The EE during the lactation period was the same as described in the previous experiment in the section "*EE for piglets.*" On the other hand, the EE in weaning consisted in: All EE used in experiment 1.

Cones: four orange traffic cones of 30 cm high.

Drums: 3 empty rectangular 5L drums.

Each stimulus was provided into the corrals during 30 minutes. Piglets interacted with the EE once a day on a schedule from 9 a.m. to 11 a.m.

de 5 minutos. Se registró la frecuencia, latencia y duración en los brazos abiertos y cerrados, frecuencia y latencia de intentos de entrada a brazos abiertos y cerrados, así como la frecuencia y latencia de evaluación de riesgos (número de veces que el animal intenta abandonar la prueba, colocándose en una postura de intento de salto). Si el animal abandonaba la arena, se daba por concluida su evaluación.

Experimento 2: Efecto del EE en diferentes etapas del desarrollo de lechones sobre su desempeño en prueba de laberinto en cruz elevada

Animales experimentales y manejo

Se seleccionaron 60 lechones desde el día de su nacimiento y se dividieron en cuatro grupos: Los animales del grupo 1 eran crías de cerdas que recibieron EE desde el día de 70 de gestación (gestación), y que posteriormente recibieron EE durante los 21 días posteriores al nacimiento (lactación). Por su parte el grupo 2, fueron lechones que recibieron EE durante destete (día posnatal 22 al 70), los del grupo 3 recibieron EE durante gestación-lactación-destete y los del grupo 4 fueron animales que nunca recibieron EE.

Durante lactación los lechones se encontraron alojados con sus madres en el área de maternidad. Durante el destete los lechones fueron separados de la madre y alojados en grupos de 15 en corrales de 3.5 m de largo por 2 m de ancho, equipados con dos bebederos, un comedero semiautomático y piso de rejilla elevado y piso inferior de cemento con declive donde recibieron alimento concentrado comercial según la etapa de desarrollo (pre iniciador, etapa 1, etapa 2 y etapa 3), a razón de 1.2 a 1.7 kg/cabeza/día.

Exposición a EE

El EE durante la etapa de lactación fue el mismo al descrito en el experimento anterior en el apartado de EE para lechones. Por su parte, el EE en destete consistió en: Todos los utilizado en el experimento 1.

Conos: cuatro conos de tráfico color naranja de 30 cm de altura.

Bidones: 3 bidones rectangulares vacíos con capacidad de 5 litros.

Cada uno de los estímulos fue ofrecido en los corrales durante 30 minutos. Los cerdos interactuaron con los EE una vez por día en horario de 9 am a 11 am.

Elevated plus maze test

On post-natal day 71, each piglet was individually exposed to the EPM test. Since these animals were much bigger than those from the previous experiment, the dimensions of the maze were increased to 2.5 x 1 m for each open arm and to 2.5 x 1 x 1 m³ for each closed arm with walls. After placing piglets in the central area of the EPM and allowing them to explore it for the same period of time as in the previous experiment, the same behaviors as described in the previous experiment were registered.

Statistical analysis

In experiment 1, a Student t-test was performed on independent samples to compare the means of behaviors between groups with and without EE during their exposure to NO and EPM tests. In experiment 2, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with STATISTICS version 10 software. To identify significant differences among groups, a *post hoc* Tukey's test was performed. Alfa value for all comparisons was $p < 0.05$.

Results and discussion

Experiment 1

The statistical analysis indicated that, during the NO test, the piglets from the group without EE presented a higher number of escape attempts and vocalizations, as well as a lower latency of first vocalization ($p < 0.05$). Total behavioral parameters assessed during the NO test were shown in Table 1.

Regarding the EPM test, the *Student t-test* identified that piglets from the group with EE showed a lower latency of first attempt to enter into open arms and a higher frequency of risk assessment, compared with piglets from the group without EE ($p < 0.05$). Total behavioral parameters assessed during the EPM test were shown in Table 2.

LECA: Latency of 1st entry into closed arms; FECA: Frequency of entries into closed arms; DCA: Duration on closed arms; LEOA: Latency of 1st entry into open arms; FEOA: Frequency of entries to open arms; DOA: Duration on open arms; LAECA: Latency of 1st attempt to enter into closed arms; FAECA: Frequency of attempts to enter into closed arms; LAEOA: Latency of 1st attempt to enter into open arms; FAEOA: Frequency of attempts to enter

Prueba de laberinto en cruz elevada

Al día posnatal 71 cada cerdo fue expuestos individualmente a la prueba de EPM. Dado que estos animales eran mucho más grandes que los del experimento anterior, las dimensiones del laberinto aumentaron a 2.5 x 1 m por cada brazo abiertos y 2.5 x 1 x 1 m³ para cada uno de los brazos cerrados con paredes. Después de colocar a los cerdos en el área central del aparato y permitirles la exploración por el mismo periodo de tiempo que el experimento anterior, se registraron los mismos comportamientos descritos en el experimento anterior.

Análisis estadístico

En el experimento 1, se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes para comparando la media de conductas del grupo con EE con el grupo sin EE durante su exposición a las pruebas de NO y EPM. En el experimento 2 utilizamos una prueba de varianza ANOVA de 1 vía con el software STATISTICS versión 10. Para identificar las diferencias entre grupos utilizamos la prueba *post hoc* tukey. El valor alfa para tomas las comparaciones fue de $p < 0.05$

Resultados y discusión

Experimento 1

El análisis estadístico indicó que, durante la prueba de NO, los lechones del grupo sin EE realizaron un mayor número de intento de escape y de vocalizaciones, así como una menor latencia a la primera vocalización ($p < 0.05$). El total de conductas comparadas se muestra en la Tabla 1.

Con respecto a la prueba de EPM, la prueba *t de student* identificó que los cerdos con EE mostraron una menor latencia de intento de entrada a los brazos abiertos y una mayor frecuencia de evaluación de riesgo, con respeto a los cerdos sin EE, $p < 0.05$. La tabla 2 muestra el total de conductas evaluadas durante la prueba.

LECA: Latencia de entrada a brazos cerrados. FECA: Frecuencia de entrada a brazos cerrados. DCA: Tiempo de permanencia en brazos cerrados. LEOA: Latencia de entrada a brazos abiertos. FEOA: Frecuencia de entrada a brazos abiertos; DOA: Tiempo de permanencia en brazos abiertos; LAECA: Latencia de intento de entrada a brazos cerrados; FAECA: Frecuencia de intento de entrada a brazos cerrados; LAEOA: Latencia de intento de entrada a

Table 1.
The behavioral parameters of piglets assessed during the novel object test (NO) in Experiment 1.

Tabla 1.
Comportamientos evaluados durante la exposición de los lechones a la prueba de objeto nuevo en experimento 1.

Behavioral parameters	Group with EE	Group without EE
Number of squares crossed	54 ± 4.0	57 ± 4.7
Latency of 1 st NO exploration (s)	66.8 ± 18.3	58.8 ± 14.0
Frequency of NO exploration	5.3 ± 0.5	6.2 ± 0.6
Duration of NO exploration (s)	17.8 ± 3.7	18.7 ± 3.2
Latency of 1 st escape attempt (s)	44.7 ± 18.0	88 ± 21.6
Frequency of escape attempt	0.8 ± 0.3*	2.9 ± 0.9
Latency of 1 st vocalization (s)	91.2 ± 17.0*	24.3 ± 5.7
Frequency of vocalization	143 ± 23.4*	242 ± 35.0
Latency of 1 st urination (s)	28.9 ± 15.8	14.2 ± 14.2
Frequency of urination	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Latency of 1 st defecation (s)	51.7 ± 19.4	37.2 ± 15.4
Frequency of defecation	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1

Latencies and duration were expressed in seconds (s). Mean ± standard error of the mean (SEM).

* Indicated significant differences among groups, $p < 0.05$.

Las latencias se expresan en segundos (s). Se muestra la media ± error estándar de la media (SEM).

* Indica diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$.

into open arms; LRA: Latency of risk assessment; FRA: Frequency of risk assessment.

Experiment 2

The analysis of variance detected significant differences for the duration in open arms among groups $F(3, 56) = 3.74$, $p < 0.05$). The *post hoc* test indicated that piglets enriched during pregnancy-lactation remained in open arms during longer periods compared with those that were provided with EE during pregnancy-lactation-weaning and with those that were not provided any EE (Figure 1). Regarding the latency of risk assessment $F(3, 56) = 2.85$, $p < 0.05$), the *post hoc* test indicated that piglets enriched during pregnancy-lactation had a higher latency of risk assessment compared with the rest of the groups (Figure 2). Finally, the statistical test showed significant differences for the frequency of risk assessment among groups ($F(3, 56) = 3.95$, $p < 0.05$). The *post hoc* test indicated that piglets enriched during pregnancy-lactation assessed a higher number of abandonments of the test, contrary to piglets enriched during pregnancy-lactation-weaning

brazos abiertos; FAEOA: Frecuencia de intento de entrada a brazos abiertos; LRA: Latencia de evaluación de riesgo; FRA: Frecuencia de evaluación de riesgos.

Experimento 2

El análisis de varianza detectó diferencias significativas en la duración de permanencia en brazos abiertos $F(3, 56) = 3.74$, $p < 0.05$. La prueba *post hoc* indicó que los lechones enriquecidos durante gestación-lactancia permanecieron en los brazos abiertos durante periodos más prolongados comparado con los que recibieron EE durante gestación, lactancia y destete, y con los que nunca recibieron EE (Figura 1). Con respecto a la latencia de evaluación de riesgo $F(3, 56) = 2.85$, $p < 0.05$. La prueba *post hoc* indicó que los lechones enriquecidos durante gestación-lactancia tuvieron una mayor latencia a la evaluación de riesgos comparado con el resto de grupos (Figura 2). Por último, la prueba estadística mostró diferencias significativas en la frecuencia de evaluación de riesgo $F(3, 56) = 3.95$, $p < 0.05$. La prueba *post hoc* indicó que los lechones enriquecidos durante gestación-lactancia

Table 2.
The behavioral parameters of piglets assessed during the elevated plus maze test in Experiment 1.

Tabla 2.
Comportamientos evaluados durante la prueba de laberinto de cruz elevada en los dos grupos de lechones en experimento 1.

Behavioral parameters	Group with EE	Group without EE
LECA (s)	11.3 ± 4.4	9.5 ± 2.9
FECA	1.2 ± 0.3	2.1 ± 0.5
DCA (s)	13.6 ± 4.5	25.5 ± 6.9
LEOA (s)	23.0 ± 3.4	29.6 ± 6.4
FEOA	1.9 ± 0.5	2.0 ± 0.3
DOA (s)	33.4 ± 4.6	27.4 ± 4.6
LAECA (s)	4.7 ± 4.7	4.9 ± 2.9
LAEOA (s)	6.4 ± 2.6*	19.5 ± 5.9
FAEOA	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.3
LRA (s)	35.2 ± 3.3	33.8 ± 4.5
FRA	3.5 ± 0.5*	5.9 ± 0.8

Latencies and durations were expressed in seconds (s). Mean ± standard error of the mean (SEM).

* Indicated significant differences among groups, $p < 0.05$.

Las latencias se expresan en segundos (s). Se muestra la media ± error estándar de la media (SEM).

* Indica diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$.

and those without EE (Figure 3). Total behavioral parameters assessed during the EPM test were shown in Table 3.

LECA: Latency of 1st entry into closed arms; FECA: Frequency of entries into closed arms; DCA: Duration on closed arms; LEOA: Latency of 1st entry into open arms; FEOA: Frequency of entries to open arms; DOA: Duration on open arms; LAECA: Latency of 1st attempt to enter into closed arms; FAECA: Frequency of attempts to enter into closed arms; LAEOA: Latency of 1st attempt to enter into open arms; FAEOA: Frequency of attempts to enter into open arms; LRA: Latency of risk assessment; FRA: Frequency of risk assessment; LU: Latency of 1st urination; FU: Frequency of urination; LD: Latency of 1st defecation; FD: Frequency of defecation.

In this study, the effect of EE on the response of infantile and juvenile piglets was evaluated during the exposure to behavioral paradigms assessing stress-related emotions, anxiety and fear. Results showed that

evaluaron un mayor número de veces el abandonar la prueba a diferencia de los lechones enriquecidos durante gestación-lactancia-destete y sin enriquecimiento (Figura 3). La Tabla 3 muestra el total de las comparaciones consideradas en la prueba de EPM.

LECA: Latencia de entrada a brazos cerrados. FECA: Frecuencia de entrada a brazos cerrados. DCA: Tiempo de permanencia en brazos cerrados. LEOA: Latencia de entrada a brazos abiertos. FEOA: Frecuencia de entrada a brazos abiertos. DOA: Tiempo de permanencia en brazos abiertos. LAECA: Latencia de intento de entrada a brazos cerrados. FAECA: Frecuencia de intento de entrada a brazos cerrados. LAEOA: Latencia de intento de entrada a brazos abiertos. FAEOA: Frecuencia de intento de entrada a brazos abiertos. LRA: Latencia de evaluación de riesgo. FRA: Frecuencia de evaluación de riesgo. LU: Latencia para la micción. FU: Frecuencia de micción. LD: Latencia para defecación. FD: Frecuencia de defecación.

En este estudio evaluamos el efecto del EE sobre la respuesta de cerdos infantiles y juveniles durante la exposición a

Table 3.
The behavioral parameters of piglets assessed during the elevated plus maze test in Experiment 2.

Tabla 3.
Comportamientos evaluados durante la exposición a la prueba de laberinto de cruz elevada en los diferentes grupos en el experimento 2.

Behavior	Groups			
	EE during pregnancy-lactation	EE during weaning	EE during pregnancy-lactation-weaning	Without EE
LECA (s)	60.1 ± 14.7	47.9 ± 14.7	45.4 ± 14.7	70.5 ± 14.7
FECA	3.0 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.3
DCA (s)	68.1 ± 15.4	107.8 ± 15.4	118.3 ± 15.4	110 ± 15.4
LEOA (s)	29 ± 13.5	46.5 ± 13.5	49.4 ± 13.5	30 ± 13.5
FEOA	4.6 ± 0.5	3.4 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.5
DOA (s)	129 ± 14.6*	90.7 ± 14.6	67 ± 14.6	70.6 ± 14.6
LAECA (s)	87.3 ± 25.3	96.1 ± 25.3	116.8 ± 25.3	89.6 ± 25.3
FAECA	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.3
LAEOA (s)	71.2 ± 20.8	83.9 ± 20.8	96 ± 20.8	89.2 ± 20.8
FAEOA	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.2
LRA (s)	95.8 ± 19.4*	44.4 ± 19.4	73.5 ± 19.4	20.6 ± 19.4
FRA	4.2 ± 0.7*	2.2 ± 0.7	1.0 ± 0.7	1.2 ± 0.7
LU (s)	32.4 ± 21.5	64 ± 21.5	38.8 ± 21.5	23 ± 21.5
FU	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
LD (s)	72.8 ± 19.5	55.4 ± 19.5	35.8 ± 19.5	76.8 ± 19.5
FD	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3

Latencies and durations were expressed in seconds (s). Mean ± standard error of the mean (SEM). * Indicated significant differences among groups, $p < 0.05$.

Las latencias se expresan en segundos (s) Se muestran las medias ± error estándar de la media (SEM). * Indica diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$.

piglets whose mothers were provided with enrichment during their pregnancy and were later stimulated during the lactation period presented a lower number of anxiety-related behaviors compared with piglets that were never provided with EE. In accordance with these first findings, results from the second experiment showed that being provided with EE during this same period improved the response of piglets while facing stress at the juvenile stage. This indicated that pre- and neo-natal periods represented one of the most crucial periods in the emotional development of piglets and that theoretically positively impacted their capacity to face aversive situations.

paradigmas conductuales que evalúan emociones asociadas al estrés, ansiedad y miedo. Los resultados mostraron que los lechones cuyas madres recibieron enriquecimiento durante la gestación, y que posteriormente fueron estimulados durante el periodo de lactancia mostraron un menor número de conductas sugerentes de ansiedad comparado con cerdos que nunca recibieron EE. De manera confirmatoria, los resultados del segundo experimento mostraron que recibir EE durante éste mismo periodo mejora la respuesta de los cerdos ante el estrés en la etapa juvenil. Esto indica que el periodo pre y neonatal representa uno de los periodos más críticos en el desarrollo emocional de los lechones y que en teoría impacta positivamente su capacidad para hacerle frente a situaciones aversivas.

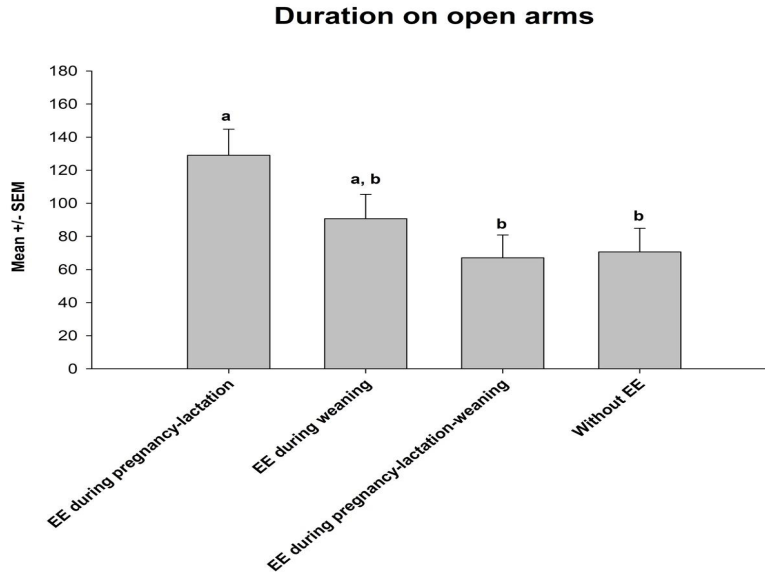


Figure 1. Duration on open arm. Data were shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Different superscript letters indicated significant differences, $p < 0.05$.

Figura 1. Duración de brazos abiertos. Se muestran las medias \pm el error estándar de las medias (SEM). Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

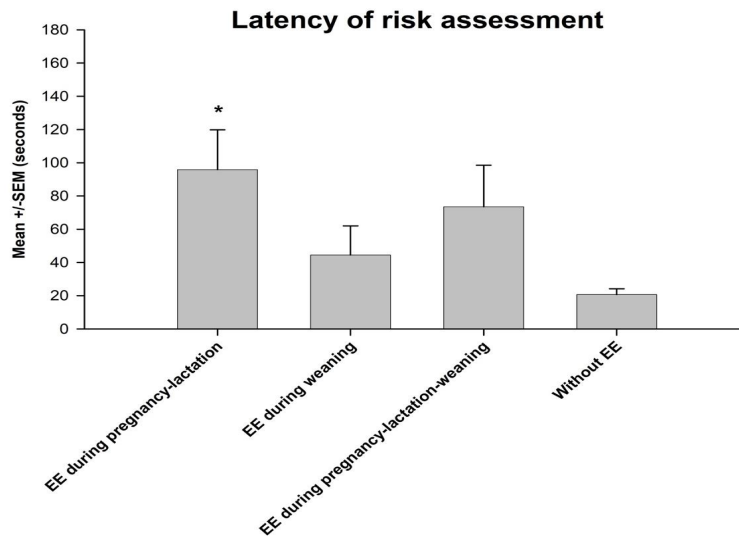


Figure 2. Latency of risk assessment.

Data were shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). * Indicated $p < 0.05$.

Figura 2. Latencia de evaluación de riesgo.

Se muestran las medias \pm el error estándar de las medias (SEM). * Indica $p < 0.05$.

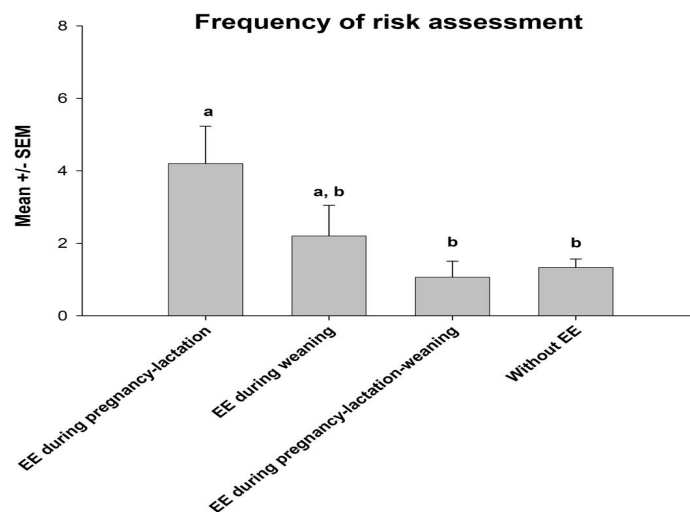


Figure 3. Frequency of risk assessment. Data were shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Different superscript letters indicated significant differences, $p < 0.05$.

Figura 3. Frecuencia de evaluación de riesgo. Se muestran las medias \pm el error estándar de las medias (SEM). Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

The EPM test has been widely used to evaluate anxiolytic effects of diverse substances (Pellow *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2004; Walf & Frye, 2007). Its principle stems from the assumption that animals naturally find aversive entering or staying in open and elevated spaces, thus the anxiety generated by this paradigm results in behavioral indicators such as the frequency of entries in open arms and the duration of presence on them, since under these conditions, the animals feel defenseless and exposed to potential threats. In this study, piglets without EE were observed to present a lower number of attempts to enter into open arms and to assess more opportunities to leave the test compared with piglets that were provided with EE. In addition, in the second experiment, piglets that were provided with EE during the same period and during their weaning improved their performance during the EPM test when they were 71 days old. Studies have demonstrated that early handling of animals including tactile stimulation has positive effects on their physical and psychological development (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). On the other hand, it has been observed that in rodents and other species, the pre- and post-natal periods are crucial steps in their development (Otten *et al.*, 2015).

El EPM ha sido ampliamente utilizado para la evaluar los efectos ansiolíticos de diversas sustancias (Pellow *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2004; Walf & Frye, 2007). Su principio parte del supuesto de que de manera natural los animales encuentran aversivo entrar o permanecer en espacios abiertos y elevados, por lo que la ansiedad que les genera este paradigma se ve reflejado en indicadores conductuales como la frecuencia de entrada en los brazos abiertos y la duración de permanencia en los mismos, ya que bajo estas condiciones los animales se sienten desprotegidos y están expuestos a potenciales amenazas. En nuestro estudio, se observó que los cerdos sin EE realizaron un menor número de intentos de entrada a los brazos abiertos y evaluaron en más ocasiones la posibilidad de abandonar la prueba comparado con los lechones con EE. Asimismo, en el segundo experimento, los cerdos que recibieron el EE durante el mismo periodo y durante destete mejoraron su desempeño durante la prueba de EPM cuando tenían 71 días de edad. Estudios han mostrado que el manejo temprano de los animales incluida la estimulación táctil, tiene efectos positivos sobre su desarrollo físico y psicológico (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha visto que en roedores y en otras especies el periodo prenatal y posnatal es una etapa crítica en su desarrollo (Otten *et al.*, 2015). Por ejemplo, se sabe que las experiencias adversas como el estrés durante

For example, it is known that adverse experiences, such as stress during pregnancy, caused complications in offspring at birth, low weight at birth, reduced litter size and lower survival rates. In addition, these animals tend to experience higher anxiety, abnormal social behaviors, increase in the HPA axis activity and cognitive deficits in adulthood (Lee *et al.*, 2007; Paris y Frye, 2011; Buss *et al.*, 2012). On the other hand, early post-natal stimulation (neo-natal handling) and the EE produce deep and long-lasting behavioral and neurobiological effects affecting the capacity of individuals to explore, regulate their emotions, learn and in motor and cognitive abilities in adulthood (Renner y Rosenzweig, 1987; Fernandez-Teruel *et al.*, 1997). The EE stimulates neurogenesis, survival, differentiation and growth of neurons in the hippocampus, a fundamental region for spatial and episodic memory of animals (Birch *et al.*, 2013), and fosters the maturation of the visual system through sensory experience (Baroncelli *et al.*, 2009). Studies suggested that tactile stimulation in early developmental stages generates small dose of stress in animals, accelerating the maturation of the central nervous system (Levine, 2005), modifies the number of glucocorticoids receptors in the hippocampus and increases the neuroplasticity (Champagne *et al.*, 2009). Since neurogenesis and neuroplasticity are directed to individual biological adaptation (Panksepp, 2004), it is thought that the effect of EE on the central nervous system of the animals aims to make individuals more able to cope with stress, and less prone to experience negative affective states as fear, anger, anxiety and depression for long periods of time (Panksepp, 2010).

In the case of pigs, studies indicated that individuals that were provided with EE during the lactation period increased the frequency of play and exploration behaviors (Held y Špinká, 2011), while it decreased anxiety responses when facing novel events (Wemelsfelder *et al.*, 2000). In this study, the behavior presented by pigs during their exposure to the EPM and NO tests were considered to be the result of an emotional conflict between experiencing fear of open environments (active avoidance) and the motivation for exploring a novel environment (Murphy *et al.*, 2014). Reluctance to enter into open arms has an ecological relevance that is associated with an innate aversive behavior of agoraphobia and fear of falling (Carobrez y Bertoglio, 2005). The results of the first experiment during the EPM tests suggested that pigs with EE did not

el embarazo, causan complicaciones en las crías al momento del nacimiento, bajo peso al nacer, tamaños reducidos de camada y tasas de supervivencia más bajas. Asimismo, dichos animales tienden a experimentar mayor ansiedad, conductas sociales anormales, incremento en la actividad del eje HPA, y déficits cognitivos en la etapa adulta (Lee *et al.*, 2007; Paris & Frye, 2011; Buss *et al.*, 2012). Por el otro lado, la estimulación posnatal temprana (manipulación neonatal) y el EE, producen profundos y duraderos efectos conductuales y neurobiológicos que influyen en la capacidad de los individuos para explorar, regular sus emociones, aprender y en habilidades motoras y cognitivas en la edad adulta (Renner & Rosenzweig, 1987; Fernandez-Teruel *et al.*, 1997). El EE estimula la neurogénesis, supervivencia, diferenciación y crecimiento de las neuronas en el hipocampo, una región fundamental para la memoria espacial y episódica de los animales (Birch *et al.*, 2013), y favorece la maduración del sistema visual mediante la experiencia sensorial (Baroncelli *et al.*, 2009). Estudios sugieren que la estimulación táctil en las primeras etapas del desarrollo genera pequeñas dosis de estrés en los animales, lo que acelera la maduración del sistema nervioso central (Levine, 2005), modifica el número de receptores de glucocorticoides en el hipocampo e incrementa la neuroplasticidad (Champagne *et al.*, 2009). Dado que la neurogénesis y neuroplasticidad están orientados a la adecuación biológica de los individuos (Panksepp, 2004), se piensa que el efecto del EE sobre el sistema nervioso central de los animales tiene como propósito hacer a los individuos más aptos para lidiar con el estrés, y menos propensos a experimentar estados afectivos negativos como el miedo, ira, ansiedad y depresión por periodos prolongados (Panksepp, 2010).

En el caso de los cerdos, estudios indican que los individuos que reciben EE durante el periodo de lactación incrementan la frecuencia de conductas de juego y exploración (Held & Špinká, 2011), mientras que disminuyen respuestas de ansiedad ante eventos novedosos (Wemelsfelder *et al.*, 2000). En nuestro estudio, consideramos que el comportamiento mostrado por los cerdos durante la exposición a la prueba de EPM y de NO, es el resultado de un conflicto emocional entre experimentar miedo a ambientes abiertos (evitación activa) y la motivación de explorar un entorno novedoso (Murphy *et al.*, 2014). La renuencia de entrar a los brazos abiertos, tiene una relevancia ecológica que se asociada con un comportamiento aversivo innato de agorafobia y miedo a las caídas (Carobrez & Bertoglio, 2005). Los resultados del primer experimento durante las pruebas de EPM sugieren que los cerdos con EE no muestran una evitación incondicionada a realizar intentos de entrada a los brazos

show an unconditioned avoidance to perform attempts to enter into open arms since their latency were lower than those of individuals without EE. Unfortunately, there was no group that was provided EE only during pregnancy or only during lactation, therefore it was not possible to determine whether there were differences among them, or whether one of these periods is more important than the other.

Regarding the NO test, piglets reared in common environment (without enrichment) were observed to present a higher number of active avoidance behaviors, suggesting that the novel object used in this study generated similar responses to those that a prey presents when facing a predator (Gray, 1987; Blanchard, 1997; Forkman *et al.*, 2007). From an evolutionary point of view, this defensive reaction allows the animals to keep safe from threats, and is probably activated when the animal is faced to situations representing a threat, such as interactions with humans, changes in its physical and social environment or aversive situations causing fear-related responses (Forkman *et al.*, 2007; Blanchard y Blanchard, 2008). However, an exaggerated or decontextualized response of pigs towards an inert object suggested that individuals without stimulation did not regulate their emotions during changes in their environment and did not adequately handle novelty, generating a higher stress, fear and anxiety. In farms, pigs are constantly exposed to aversive situations, such as changes of corral, application of injections, ear tagging, among others. Therefore, the present data suggested that the EE can help pigs to reduce their stress-, fear- and anxiety-related response during their time in the production chain.

Moreover, pigs without EE were found to perform a higher number of vocalizations while exposed to the NO test. In highly vocal animals as pigs, vocalizations have been found to be associated to a great number of emotional responses (Leliveld *et al.*, 2016), for example, they play a very important role in individuals recognition (Weary y Fraser, 1995; Melišová *et al.*, 2011), during feeding (Jensen y Algers, 1984; Ruth C Newberry y Wood-Gush, 1985), hierarchical organization (Drake *et al.*, 2008), pain (Weary *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2010), transport (Brandt y Aaslyng, 2015) and social isolation (Marchant *et al.*, 2001). Nevertheless, increases in

abiertos ya que su latencia fue menor comparada con los individuos sin EE. Desafortunadamente, no contamos con un grupo que recibiera solo EE durante gestación o solo durante lactación por lo que por ahora no nos es posible determinar si existen diferencias entre ellos, o si uno de estos periodos es más importante que el otro.

Con respecto a la prueba de NO, se observó que los lechones criados en ambientes comunes (sin enriquecimiento) mostraron un mayor número de comportamientos de evitación activa, lo que sugiere que el objeto nuevo utilizado, generó respuestas similares a las que presenta una presa ante un depredador (Gray, 1987; Blanchard, 1997; Forkman *et al.*, 2007). Desde un punto de vista evolutivo, esta reacción defensiva permite a los animales mantenerse a salvo de amenazas, y seguramente es activada cuando el animal se enfrenta a situaciones que representan una amenaza como las interacciones con humanos, cambios en su entorno físico y social o situaciones aversivas que provoquen respuestas relacionadas con el miedo (Forkman *et al.*, 2007; Blanchard & Blanchard, 2008). No obstante, una respuesta exagerada o descontextualizada por parte de los cerdos hacia un objeto inerte, sugiere que los individuos sin estimulación no regulan adecuadamente sus emociones durante cambios en su ambiente y que no gestionan adecuadamente la novedad, lo cual les genera un mayor estrés, miedo y ansiedad. En unidades de producción los cerdos son constantemente expuestos a situaciones aversivas como cambios de corral, aplicación de inyecciones, aretado, entre otros. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que el EE puede ayudar a los cerdos a disminuir la respuesta de estrés, miedo y ansiedad durante su paso por la cadena productiva.

Aunado a esto, se encontró que los cerdos sin EE realizaron un mayor número de vocalizaciones cuando se expusieron a la prueba de NO. En animales altamente vocales como los cerdos, se ha encontrado que las vocalizaciones están asociadas a un gran número de respuestas emocionales (Leliveld *et al.*, 2016), por ejemplo, juega un papel muy importante en el reconocimiento de individuos (Weary & Fraser, 1995; Melišová *et al.*, 2011), durante la alimentación (Jensen & Algers, 1984; Ruth C Newberry y Wood-Gush, 1985), la jerarquización (Drake *et al.*, 2008), el dolor (Weary *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2010), el transporte (Brandt & Aaslyng, 2015) y el aislamiento social (Marchant *et al.*, 2001). No obstante incrementos en su frecuencia están asociados con altos niveles de excitación (elevado impulso simpático-adreno-medular), como cuando un individuo es aislado de su grupo y es expuestos a un entorno novedoso (Herskin & Jensen, 2000). Los hallazgos de nuestro estudio sugieren

its frequency are associated with high levels of excitation (elevated sympathetic-adrenomedullary stimulus), like when an individual is isolated from its group and is exposed to a novel environment (Herskin y Jensen, 2000). Findings of the present study suggested that the reduction in the quantity of anxiety- and fear-related signs in animals enriched during pregnancy and lactation periods implicates a better capacity to regulate their emotions during aversive situations.

Among agricultural activities, pig farming is one of the most intensive production systems, in which the exploitation of animals is successfully maximized at low cost. Although this study did not consider productive parameters, such as weight gain, litter weight at weaning and daily food intake, stress is known to decrease food intake and feed conversion rate (Figuroa *et al.*, 2013), hence, it can be speculated that if animals are able to cope with stress and are in a welfare condition, they will have a higher feed intake and consequently, higher productive indicators. Further studies on AW, ethology and stress in animals intended for human consumption should consider the effect of EE on production, which would very likely encourage producers and entrepreneurs to implement such programs in pig farms (Van de Weerd & Day, 2009).

Overall, results of the present study indicated that the EE during pregnancy and the first weeks of life can improve the capacity of pigs to face novel and stressing situations, such as those they face throughout their lives in most of farms around the world. One of the most relevant findings of this study was the identification of the pre- and neo-natal periods as ones of the most beneficial for emotional development in pigs. This has a great relevance and application for farms, since it represents a practical, inexpensive and science-based approach to improve pig welfare during the production chain. However, a higher number of studies is required to determine whether the effect of EE during these stages persists lifelong and whether it has any effect on its productive parameters, as well as on the activation of the HPA axis and glucocorticosteroids levels, mainly cortisol, and on the activity of the immune system, both at cellular and humoral scales.

Conclusion

Results of the present study showed that piglets reared in enriched environments during pre- and neo-natal periods presented a better performance in

que la reducción en la cantidad de señales relacionadas con ansiedad y miedo en los animales enriquecidos durante la gestación y lactación implica una mejor capacidad para regular sus emociones durante situaciones aversivas.

En las actividades agropecuarias, la porcicultura es uno de los sistemas de producción más intensivos, en los que se logra maximizar el aprovechamiento de los animales a un bajo costo. Si bien este estudio no consideró parámetros productivos como ganancia de peso, peso de la camada al destete y consumo diario de alimento, se sabe que el estrés disminuye el consumo de alimento y la conversión alimenticia (Figuroa *et al.*, 2013), por lo tanto, podemos especular que si los animales son capaces de lidiar con el estrés y se encuentran en bienestar tendrán un mayor consumo de alimento y en consecuencia mejores indicadores productivos. En el futuro, estudios en materia de AW, etología y estrés en animales de consumo, deberían considerar el efecto del EE sobre la producción, lo cual seguramente alentaría a los productores y empresarios a implementar dichos programas en unidades de producción (van de Weerd & Day, 2009).

En términos generales, nuestros resultados indican que el EE durante la gestación y las primeras semanas de vida puede mejorar la capacidad de los cerdos para hacerle frente a situaciones novedosas, y estresantes como las que enfrentan a lo largo de su vida en la mayoría de las unidades de producción alrededor del mundo. Uno de los hallazgos más relevantes de nuestro estudio, fue identificar que el periodo prenatal y neonatal es uno de los que más beneficia el desarrollo emocional de los cerdos. Esto tiene gran relevancia y aplicación para las unidades de producción ya que representa una manera práctica, económica y con sustento científico sobre cómo mejorar el bienestar de los cerdos durante la cadena productiva. No obstante, se requiere de un mayor número de estudios para determinar si el EE durante estas etapas perdura durante toda la vida del animal y si tiene algún efecto sobre sus parámetros productivos, e incluso sobre la activación del eje HPA y en los niveles de glucocorticosteroides, principalmente cortisol, y la actividad del sistema inmune tanto a nivel celular como humoral.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que los lechones criados en ambientes enriquecidos durante los periodos prenatal y neonatal muestran un mejor desempeño en las pruebas de NO y EPM comparado con los cerdos criados

the NO and EPM tests compared with piglets reared in typical production environments (without EE). Similarly, this study revealed that the EE during this same period had a greater benefit compared with enrichments after the weaning. In conclusion, this study indicated that the EE is a good strategy to improve AW in farmed pigs.

en ambientes típicos de producción (sin EE). De igual manera nuestro estudio reveló que el EE durante este mismo periodo, tiene un mayor beneficio comparado con enriquecimientos posteriores al destete. En conclusión, nuestros estudios indican que el EE es una buena estrategia para mejorar el AW de los cerdos en granjas.

References

- Andersen, I. L., Bøe, K. E., Førevik, G., Janczak, A. M. and Bakken, M. (2000). Behavioural evaluation of methods for assessing fear responses in weaned pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 69(3): 227-240. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00133-7)
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Sale, A. and Maffei, L. (2009). Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death And Differentiation*, 17: 1092. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.193>
- Birch, A. M., McGarry, N. B. and Kelly, Á. M. (2013). Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, 23(6): 437-450. <https://doi.org/10.1002/hipo.22103>
- Blanchard, D. C. (1997). Stimulus, environmental, and pharmacological control of defensive behaviors *Learning, motivation, and cognition: The functional behaviorism of Robert C. Bolles*. (pp. 283-303). Washington, DC, US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/10223-014>
- Blanchard, D. C. & Blanchard, R. J. (2008). Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel & D. Nutt (Eds.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 17, pp. 63-79): Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Boissy, A. (1995). Fear and Fearfulness in Animals. *The Quarterly Review of Biology*, 70(2): 165-191. <https://doi.org/10.1086/418981>
- Brajon, S., Ringgenberg, N., Torrey, S., Bergeron, R. and Devillers, N. (2017). Impact of prenatal stress and environmental enrichment prior to weaning on activity and social behaviour of piglets (*Sus scrofa*). *Applied Animal Behaviour Science*, 197: 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.09.005>
- Brandt, P. & Aaslyng, M. D. (2015). Welfare measurements of finishing pigs on the day of slaughter: A review. *Meat Science*, 103: 13-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.12.004>
- Buss, C., Davis, E., Shahbaba, B., Pruessner, J., Head, K. and Sandman, C. (2012). Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *PNAS*, 109, E1312-E1319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201295109>
- Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8): 1193-1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>
- Colson, V., Martin, E., Orgeur, P. and Prunier, A. (2012). Influence of housing and social changes on growth, behaviour and cortisol in piglets at weaning. *Physiology & Behavior*, 107(1): 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.001>
- Champagne, D. L., Ronald de Kloet, E. and Joëls, M. (2009). Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 14(3): 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2008.11.006>
- Donald, R. D., Healy, S. D., Lawrence, A. B. and Rutherford, K. M. D. (2011). Emotionality in growing pigs: Is the open field a valid test? *Physiology & Behavior*, 104(5): 906-913. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.031>
- Dong, G. & Pluske, J. (2007). The low feed intake in newly-weaned pigs: problems and possible solutions. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 20(3): 440-452. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.440>
- Douglas, C., Bateson, M., Walsh, C., Bédoué, A. and Edwards, S. A. (2012). Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 139(1): 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.02.018>

- Drake, A., Fraser, D. and Weary, D. M. (2008). Parent-offspring resource allocation in domestic pigs. *Behavioral ecology and sociobiology*, 62(3): 309-319. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0418-y>
- Edwards, S. A. (2002). Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions? *Livestock Production Science*, 78(1): 3-12. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00180-X)
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R., Castellano, B., Gonzalez, B. and Tobena, A. (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behavior genetics*, 27(6): 513-526. <https://doi.org/10.1023/A:1021400830503>
- Fernández-Teruel, A., Giménez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T. and Tobeña, 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. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00787-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00787-6)
- Figuroa, J., Solà-Oriol, D., Manteca, X. and Pérez, J. F. (2013). Social learning of feeding behaviour in pigs: Effects of neophobia and familiarity with the demonstrator conspecific. *Applied Animal Behaviour Science*, 148(1-2): 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.06.002>
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M. C., Canali, E. and Jones, R. B. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior*, 92(3): 340-374. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.016>
- Gadd, J. (2011). *Modern pig production technology: a practical guide to profit*: Nottingham University Press.
- García, E. (1988). Distribución de los grupos climáticos de Köppen en México. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Primera parte. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 4a Ed. México DF.*
- Gray, J. A. (1987). *The Psychology of Fear and Stress* (C. U. Press Ed. Cambridge ed.).
- Held, S. D. E., & Špinka, M. (2011). Animal play and animal welfare. *Animal Behaviour*, 81(5): 891-899. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007>
- Herskin, M. S. & Jensen, K. H. (2000). Effects of different degrees of social isolation on the behaviour of weaned piglets kept for experimental purposes. *Animal Welfare*, 9(3): 237-249. <https://www.ingentaconnect.com/content/ufaw/aw/2000/00000009/00000003/art00002>
- Holinger, M., Früh, B., Stoll, P., Graage, R., Wirth, S., Bruckmaier, R., Prunier A., Kreuzer M. and Hillmann, E. (2018). Chronic intermittent stress exposure and access to grass silage interact differently in their effect on behaviour, gastric health and stress physiology of entire or castrated male growing-finishing pigs. *Physiology & Behavior*, 195: 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.07.019>
- Hyun, Y., Ellis, M., Riskowski, G. and Johnson, R. W. (1998). Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *Journal of animal science*, 76(3): 721-727. <https://doi.org/10.2527/1998.763721x>
- Jansen, J., Bolhuis, J. E., Schouten, W. G., Spruijt, B. M. and Wiegant, V. M. (2009). Spatial learning in pigs: effects of environmental enrichment and individual characteristics on behaviour and performance. *Animal Cognition*, 12(2): 303-315. <https://doi.org/10.1007/s10071-008-0191-y>
- Jensen, P. & Algers, B. (1984). An ethogram of piglet vocalizations during suckling. *Applied Animal Ethology*, 11(3): 237-248. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(84\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0304-3762(84)90030-0)
- Lee, P., Brady, D., Shapiro, R., Dorsa, D. and Koenig, J. (2007). Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin. *Brain Research*, 1156: 152-167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.042>
- Leliveld, L. M. C., Döpjan, S., Tuchscherer, A. and Puppe, B. (2016). Behavioural and physiological measures indicate subtle variations in the emotional valence of young pigs. *Physiology & Behavior*, 157: 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.002>
- Leslie, E., Hernández-Jover, M., Newman, R. and Holyoake, P. (2010). Assessment of acute pain experienced by piglets from ear tagging, ear notching and intraperitoneal injectable transponders. *Applied Animal Behaviour Science*, 127(3): 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.09.006>
- Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10):

- 939-946. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.03.013>
- Manteuffel, G., Puppe, B. and Schön, P. C. (2004). Vocalization of farm animals as a measure of welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(1): 163-182. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.012>
- Marcet-Rius, M., Kalonji, G., Cozzi, A., Bienboire-Frosini, C., Monneret, P., Kowalczyk, I., Teruel E., Codecasa E. and Pageat, P. (2019). Effects of straw provision, as environmental enrichment, on behavioural indicators of welfare and emotions in pigs reared in an experimental system. *Livestock Science*, 221: 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.020>
- Marchant, J. N., Whittaker, X. and Broom, D. M. (2001). Vocalisations of the adult female domestic pig during a standard human approach test and their relationships with behavioural and heart rate measures. *Applied Animal Behaviour Science*, 72(1): 23-39. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00190-8)
- Martin, J. E., Ison, S. H. and Baxter, E. M. (2015). The influence of neonatal environment on piglet play behaviour and post-weaning social and cognitive development. *Applied Animal Behaviour Science*, 163: 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.11.022>
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886(1-2): 172-189. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02950-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02950-4)
- McLamb, B. L., Gibson, A. J., Overman, E. L., Stahl, C. and Moeser, A. J. (2013). Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic E. coli challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *PLoS One*, 8(4): e59838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059838>
- Melišová, M., Illmann, G., Andersen, I. L., Vasdal, G. and Haman, J. (2011). Can sow pre-lying communication or good piglet condition prevent piglets from getting crushed? *Applied Animal Behaviour Science*, 134(3): 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.06.015>
- Merlot, E., Vincent, A., Thomas, F., Meunier-Salaün, M.-C., Damon, M., Robert, F., Dourmad Y., Lebret B. and Prunier, A. (2012). Health and immune traits of Basque and Large White pigs housed in a conventional or enriched environment. *animal*, 6(8): 1290-1299. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000080>
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*, 1: 21.
- 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*. *Applied Animal Behaviour Science*, 159: 9-28. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.002>
- Newberry, R. C. (1995). Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44(2): 229-243. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00616-Z](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00616-Z)
- Newberry, R. C. & Wood-Gush, D. G. (1985). The suckling behaviour of domestic pigs in a semi-natural environment. *Behaviour*, 95(1-2): 11-25. <https://doi.org/10.1163/156853985X00028>
- OIE (La Organización Mundial de Sanidad Animal). (2008). *Introduction to the recommendations for animal welfare*. Terrestrial Animal Health.
- Otten, W., Kanitz, E. & Tuchscherer, M. (2015). The impact of pre-natal stress on offspring development in pigs. *The Journal of Agricultural Science*, 153(5): 907-919. <https://doi.org/10.1017/S0021859614001361>
- Panksepp, J. (1982). Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behavioral and Brain sciences*, 5(3): 407-422. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00012759>
- Panksepp, J. (2004). *Affective neuroscience: The foundations of human and animal emotions*: Oxford university press.
- Panksepp, J. (2010). Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behavioral and Brain sciences*, 5(3): 407-422. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00012759>
- Paris, J. & Frye, C. (2011). Juvenile offspring of rats exposed to restraint stress in late gestation have impaired cognitive performance and dysregulated progesterone formation. *Stress*, 14: 23-32. <https://doi.org/10.3109/10253890.2010.512375>
- Parker, M., O'Connor, E., McLeman, M., Demmers, T., Lowe, J., Owen, R., Wathes C.M. and Abeyesinghe, S. (2010). The impact of chronic environmental stressors on growing pigs, *Sus scrofa* (Part 2): social behaviour. *animal*, 4(11), 1910-1921. <https://doi.org/10.1017/S1751731110001072>
- Paul, E. S. & Mendl, M. T. (2018). Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective. *Applied Animal Behaviour Science*, 205: 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.01.008>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. and Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as

- a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3): 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Renner, M. J. & Rosenzweig, M. R. (1987). *Enriched and impoverished environments: Effects on brain and behavior*. Springer.
- Rutherford, K. M. D., Donald, R. D., Lawrence, A. B., & Wemelsfelder, F. (2012). Qualitative Behavioural Assessment of emotionality in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 139(3): 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.04.004>
- Shepherdson, D. (1989). Environmental enrichment: Measuring the behaviour of animals. *RATEL: Journal of the Association of British Wild Animal Keepers*, 16: 134-139.
- Siegford, J. M., Rucker, G. and Zanella, A. J. (2008). Effects of pre-weaning exposure to a maze on stress responses in pigs at weaning and on subsequent performance in spatial and fear-related tests. *Applied Animal Behaviour Science*, 110(1): 189-202. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.022>
- Tallet, C., Brajon, S., Devillers, N. and Lensink, J. (2018). 13 - Pig-human interactions: Creating a positive perception of humans to ensure pig welfare. In M. Špinko (Ed.), *Advances in Pig Welfare* (pp. 381-398): Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101012-9.00008-3>
- Tönepöhl, B., Appel, A. K., Welp, S., Voß, B., König von Borstel, U. and Gauly, M. (2012). Effect of marginal environmental and social enrichment during rearing on pigs' reactions to novelty, conspecifics and handling. *Applied Animal Behaviour Science*, 140(3): 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.05.002>
- USDA-FAS (Foreign Agricultural Service). (2019). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*.
- Valros, A. (2018). Chapter 5 - Tail biting. In M. Špinko (Ed.), *Advances in Pig Welfare* (pp. 137-166): Woodhead Publishing.
- van de Weerd, H. A. and Day, J. E. L. (2009). A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.001>
- Verdon, M., Morrison, R. S. and Hemsworth, P. H. (2016). Rearing piglets in multi-litter group lactation systems: Effects on piglet aggression and injuries post-weaning. *Applied Animal Behaviour Science*, 183: 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.05.008>
- Walf, A. A. & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2: 322. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Weary, D. M., Braithwaite, L. A. and Fraser, D. (1998). Vocal response to pain in piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, 56(2): 161-172. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00092-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00092-0)
- Weary, D. M. & Fraser, D. (1995). Calling by domestic piglets: reliable signals of need? *Animal Behaviour*, 50(4): 1047-1055. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(95\)80105-7](https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)80105-7)
- Wemelsfelder, F., Haskell, M., Mendl, M. T., Calvert, S. and Lawrence, A. B. (2000). Diversity of behaviour during novel object tests is reduced in pigs housed in substrate-impooverished conditions. *Animal Behaviour*, 60(3): 385-394. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1466>
- Wilson, M. A., Burghardt, P. R., Ford, K. A., Wilkinson, M. B. and Primeaux, S. D. (2004). Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(3): 445-458. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.017>
- Yang, C.-H., Ko, H.-L., Salazar, L. C., Llonch, L., Manteca, X., Camerlink, I. and Llonch, P. (2018). Pre-weaning environmental enrichment increases piglets' object play behaviour on a large scale commercial pig farm. *Applied Animal Behaviour Science*, 202: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.02.004>
- Young, R. J. (2013). *Environmental enrichment for captive animals*: John Wiley & Sons.