



Densidad de alojamiento, sexo y estación del año sobre la inmovilidad tónica en pollos parrilleros

Eliana Gallard^{1*} ; Marcela Menichelli¹ ; Ricardo Di Masso² ; Fernando Revidatti³ 

¹INTA EEA Reconquista. RN11 Km 773. 3560, Reconquista, Santa Fe, Argentina.

²Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Argentina.

³Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra Producción de Aves. Argentina.

*Corresponding author: gallard.eliana@inta.gob.ar

Recibido: Enero 2021; Aceptado: Diciembre 2021; Publicado: Marzo 2022.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de la densidad de alojamiento, la época del año y el sexo sobre el tiempo de latencia y el número de intentos de inducción de la inmovilidad tónica en pollos parrilleros en un sistema de producción industrial. **Material y métodos.** Se empleó un total de 216.000 pollos híbridos comerciales Cobb500, criados en lotes mixtos, 54.000 en cada una de las cuatro estaciones del año, en galpones oscurecidos de ventilación forzada tipo túnel, bajo dos densidades de alojamiento: estándar (14 pollos/m²) y reducida (12 pollos/m²). El día 35 se extrajeron 90 aves de cada sexo, de cada densidad y en cada estación del año, se realizó la prueba de inmovilidad tónica y se registró el tiempo de latencia en segundos (s) y el número de intentos de inducción. **Resultados.** La densidad afectó significativamente ($p < 0.005$) el tiempo de latencia, con valores de mediana (Mna) y rango intercuartílico (RI) de 72 s (38-143) para la densidad estándar y 63 s (36-127) para la densidad reducida. En el número de intentos la diferencia fue marginalmente significativa. No se observaron diferencias significativas entre sexos ni entre estaciones en ninguna de las dos variables. **Conclusiones.** La duración de la inmovilidad tónica es una herramienta útil como indicador de miedo en situaciones específicas. La disminución de la densidad reduce el período de latencia y se requieren más intentos de inducción en pollos, en tanto que el sexo y la estación del año no producen el mismo efecto.

Palabras clave: Ambiente; bienestar animal; carne de aves; estrés; inducción; miedo (*Fuente: CAB thesaurus, AIMS*).

ABSTRACT

Objective. To assess the effect of stocking density, season of the year, and sex on latency time and number of attempts required to induce tonic immobility in broiler chickens in an industrial production system. **Material and methods.** A total of 216.000 commercial hybrid Cobb500 chickens were used,

Como citar (Vancouver).

Gallard E, Menichelli M, Di Masso R, Revidatti F. Densidad de alojamiento, sexo y estación del año sobre la inmovilidad tónica en pollos parrilleros. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(2):e2151. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2151>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

reared in mixed batches, 54.000 in each of the four seasons of the year, in dark houses with forced tunnel ventilation, under two stocking densities: standard (14 chickens/m²) and reduced (12 chickens/m²). On day 35 of the productive cycle, 90 birds of each sex, of each density and in each season of the year were sampled and the tonic immobility test was performed, recording the latency time in seconds (s) and the number of induction attempts. **Results.** Stocking density significantly affected ($p < 0.005$) latency time with values (median and interquartile range) of 72 s (38-143) for standard density and 63 s (36-127) for reduced density. The difference was marginally significant for the number of attempts. Non-significant differences were observed between sexes and among seasons in any of the two variables. **Conclusions.** The duration of tonic immobility is a useful tool as an indicator of fear in specific situations. Decreasing the stocking density decreases the latency period and more induction attempts are required in chickens, while sex and season do not produce similar effects.

Keywords: Environment; animal welfare; poultry meat; stress; induction; fear (*Source: CAB thesaurus, AIMS*).

INTRODUCCIÓN

La producción industrial de carne de aves, así como otras cadenas que involucran la crianza intensiva de animales, conlleva el interés por el cumplimiento de los dominios del bienestar animal. Estos refieren a un componente físico que incluye la nutrición, el ambiente, el comportamiento y la salud, y un componente ligado a los estados mentales entre los que se encuentra el miedo (1). El miedo es un estado indeseable de sufrimiento que sirve a los animales para protegerse de peligros potenciales tales como predadores, interacción con personas o cambios en el ambiente. Puede manifestarse mediante escapes violentos o pánico, heridas, dolor y, en algunos casos, la muerte del individuo. Las respuestas habituales frente a una amenaza son el intento de escape, el vuelo, la pelea o la inmovilización del animal amenazado. Se han utilizado diferentes pruebas para evaluar el miedo en las aves (2). Entre ellas se encuentra la prueba de inmovilidad tónica, descrita por primera vez por Schwenter en el año 1636 (3). Definida como una conducta no aprendida provocada por la restricción física, caracterizada por un estado catatónico de capacidad de respuesta reducida y duración variable (4), es uno de los indicadores más utilizados para evaluar respuestas a situaciones de estrés en la gallina. Mediante su aplicación es posible detectar la presencia de miedo en los pollos como paso previo a la implementación de acciones orientadas a reducirlo o evitarlo.

Es conocido que el miedo, a través de la generación de una respuesta de estrés, afecta la producción y disminuye la rentabilidad en los sistemas avícolas intensivos (5). La prueba de inmovilidad tónica ha sido empleada para

evaluar posibles diferencias entre sexos en relación con la respuesta de estrés a largo plazo, monitoreando la reacción de los pollos después de haber sido expuestos a un corto período de estrés en su vida temprana, aunque los resultados no han sido concluyentes (6).

La inmovilidad tónica también es un indicador útil para evaluar la adaptabilidad de las aves a variaciones en las condiciones climáticas de crianza. Las reacciones de miedo provocadas en diferentes situaciones climáticas producen el despliegue de comportamientos defensivos cuya intensidad puede variar de acuerdo con la situación emocional del animal en respuesta al entorno (7). Se ha observado que el tiempo de inmovilidad se encuentra influido por la densidad de alojamiento aplicada en distintas situaciones productivas. Más allá de los conocimientos existentes sobre el efecto de estos factores sobre la inmovilidad tónica, se hace necesaria su evaluación en las condiciones extremas del subtrópico húmedo, como las existentes en el noreste de la provincia de Santa Fe.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la densidad de alojamiento, la época del año y el sexo sobre el tiempo de latencia y el número de intentos de inducción de la inmovilidad tónica en pollos parrilleros en un sistema de producción industrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización y animales. El trabajo se llevó a cabo en una granja comercial del área de influencia del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Reconquista (Santa Fe, Argentina) a 28°45'11" latitud sur y 59°28'05"

longitud oeste. Se empleó un total de 216.000 pollos híbridos comerciales Cobb500, criados en lotes mixtos, 54.000 en cada una de las cuatro estaciones del año, en galpones *black out* de ventilación forzada tipo túnel, bajo dos densidades de alojamiento: estándar (14 pollos/m²) y reducida (12 pollos/m²).

Variable de estudio. En cada estación del año y en el día 35 del ciclo de crianza, se extrajo de cada densidad una muestra aleatoria de 180 aves, 90 de cada sexo, que no habían sido manipuladas previamente. Estas se sometieron a la prueba de inmovilidad tónica, la que se indujo siguiendo la metodología descrita por Jones y Faure (8). Brevemente, una vez atrapada, cada ave se colocó en decúbito dorsal, sobre una superficie de plástico con la cabeza colgando. En dicha posición, el operador la contuvo durante 15 segundos ejerciendo una leve presión con la mano sobre el esternón. El observador se sentó a plena vista del ave, aproximadamente a 1 m de distancia, y fijó sus ojos en esta haciendo uso de la propiedad del contacto visual para inducir miedo. Si el ave permaneció inmóvil durante un lapso mínimo de 10 s después de que el operador hubiera retirado su mano, la inducción se consideró satisfactoria. En tal situación, el observador cronometró el tiempo hasta que el ave se enderezó, lapso denominado tiempo de latencia. Si el ave se enderezó en menos de 10 s, el intento de inducción de la inmovilidad tónica se consideró nulo y se repitió el procedimiento de restricción. Esta secuencia se reiteró hasta un máximo de tres veces y se registró el número total de intentos de inducción. Si, luego

del tercer intento, no se logró la inducción de la inmovilidad, a los efectos del análisis se asignó un valor 0. Si el ave no mostró una respuesta de enderezamiento durante un período de prueba de 5 minutos, se le otorgó al tiempo de latencia una puntuación máxima de 300 s. En consecuencia, las variables duración de la inmovilidad tónica y número de intentos de inducción tomaron valores comprendidos entre 0 y 300 s y entre 1 y 3 intentos, respectivamente.

Análisis estadístico. Los efectos de la densidad de alojamiento y del sexo sobre el tiempo de latencia se evaluaron, por separado, con la prueba U de Mann Whitney de comparación de medianas, mientras que, para el efecto de la estación del año, se utilizó el análisis de la variancia a un criterio, por rangos, de Kruskal-Wallis. El efecto sobre el número de intentos se evaluó con la prueba de Chi Cuadrado.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el tiempo de latencia y el número de intentos requeridos para lograr la inmovilidad tónica en función de las dos densidades de alojamiento estudiadas. La densidad afectó en forma significativa el tiempo de latencia con mayores valores para las aves bajo densidad estándar. En el caso del número de intentos, la diferencia fue marginalmente significativa, con una mayor proporción de pollos criados con densidad estándar inducidos a la inmovilidad tónica en el primer intento.

Tabla 1. Tiempo de latencia (mediana y rango intercuartílico) y número de intentos de inducción de inmovilidad tónica según densidad de alojamiento en pollos parrilleros en un sistema de producción industrial.

Densidad de alojamiento	Tiempo de latencia (s)		Número de intentos de inducción. Frecuencias absolutas y relativas			
	Mna (RI)	p	Un intento	Dos intentos	Más de dos intentos	p
Estándar	72 (38-143)	0.005	661 (91.8%)	56 (7.8%)	3 (0.4%)	0.052
Reducida	63 (32-127)		639 (88.8%)	71 (9.9%)	10 (1.3%)	

No se observaron diferencias significativas entre sexos en ninguna de las dos variables (Tabla 2).

La tabla 3 resume el efecto de la densidad de alojamiento en cada sexo. Tanto en machos como en hembras, el tiempo mediano de latencia fue mayor en las aves bajo densidad estándar.

No se observaron diferencias significativas en el número de intentos de inducción.

No se observaron diferencias significativas entre estaciones del año en los valores de los dos indicadores asociados a la prueba de inmovilidad tónica (Tabla 4).

Tabla 2. Efecto del sexo sobre el tiempo de latencia (mediana y rango intercuartílico) y el número de intentos de inducción de inmovilidad tónica en pollos parrilleros en un sistema de producción industrial.

Sexo	Tiempo de latencia (s)		Número de intentos de inducción. Frecuencias absolutas y relativas			
	Mna (RI)	p	Un intento	Dos intentos	Más de dos intentos	p
Machos	67 (33-136)	0,19	645 (89.6%)	65 (9%)	10 (1.4%)	0.136
Hembras	70 (36-133)		656 (91.1%)	61 (8.5%)	3 (0.4%)	

Tabla 3. Efecto del sexo sobre el tiempo de latencia (mediana y rango intercuartílico) y el número de intentos de inducción de inmovilidad tónica en pollos parrilleros criados con dos densidades de alojamiento, en un sistema de producción industrial.

Sexo	Densidad	Tiempo de latencia (s)		Número de intentos de inducción. Frecuencias absolutas y relativas			
		Mna	p	Un intento	Dos intentos	Más de dos intentos	p
Machos	Estándar	73 (38-146)	0.003	333 (92.5%)	24 (6.7%)	3 (0.8%)	0.079
	Reducida	55 (30-124)		315 (87.5%)	39 (10.8%)	6 (1.7%)	
Hembras	Estándar	72 (37-140)	0.005	332 (92.2%)	28 (7.8%)	0 (0%)	0.173
	Reducida	68 (34-130)		324 (90%)	33 (9.2%)	3 (0.8%)	

Tabla 4. Tiempo de latencia (mediana y rango intercuartílico) y número de intentos de inducción de inmovilidad tónica por estación del año en pollos parrilleros en un sistema de producción industrial.

Estación del año	Tiempo de latencia (s)		Número de intentos de inducción. Frecuencias absolutas y relativas			
	Mna (RI)	p	Un intento	Dos intentos	Más de dos intentos	p
Verano	63 (35-110)	0.466	319 (88.6%)	34 (9.5%)	7 (1.9%)	0,063
Otoño	78 (37-144)		330 (91.7%)	29 (8.1%)	1 (0.2%)	
Invierno	73 (33-144)		334 (92.8%)	23 (6.4%)	3 (0.8%)	
Primavera	70,5 (33-147)		318 (88.3%)	40 (11.1%)	2 (0.6%)	

La tabla 5 muestra los kilogramos de ave producidos por unidad de superficie de galpón al final de la crianza y la diferencia relativa entre ambas densidades de alojamiento según cada estación del año. Estos resultados muestran que la reducción de la densidad de alojamiento ocasionó una disminución en la cantidad de kilogramos alcanzados por metro cuadrado. De esta manera, el peso vivo superior obtenido individualmente por las aves alojadas con densidad reducida no fue suficiente

para compensar la mayor producción global conseguida en el galpón con densidad estándar.

La figura 1 muestra el efecto de la densidad de alojamiento en cada una de las estaciones del año. No se observaron diferencias significativas según densidad en verano ($p=0.169$) ni en otoño ($p=0.898$), en tanto que el tiempo de latencia de las aves alojadas con densidad estándar fue estadísticamente mayor en invierno ($p=0.031$) y mostró una diferencia marginalmente

significativa en el mismo sentido en primavera ($p=0.057$). En estas dos últimas estaciones se observaron, además, diferencias en los valores que definen el límite superior del tercer cuartil, los que fueron mayores en las aves alojadas con densidad estándar, por lo que aquellas alojadas con densidad reducida, que ocupan dicho cuartil, presentan un comportamiento más concentrado de los valores del tiempo de latencia. Al observar el número de intentos de inducción en verano y otoño, se constató que un

mayor número de pollos en la densidad estándar requirieron un intento de inducción en ambas estaciones, diferencia que fue estadísticamente significativa en verano ($p=0.003$), no así en otoño ($p=0.065$), aunque con una tendencia marcada. En cuanto a lo observado en invierno y primavera, el número de intentos de inducción no fue diferente ($p=0.898$ y $p=0.870$, respectivamente) y los valores entre las densidades fueron casi coincidentes.

Tabla 5. Producción de carne y diferencia relativa al final del ciclo de pollos parrilleros criados con dos densidades de alojamiento en las cuatro estaciones del año en un sistema de producción industrial.

Densidad de alojamiento	Estación del año			
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Estándar (kg/m ²)	38.2	37.8	35.3	38.4
Reducida (kg/m ²)	35.2	34.0	34.8	35.5
Diferencia relativa (%)	7.85	10.05	1.42	7.55

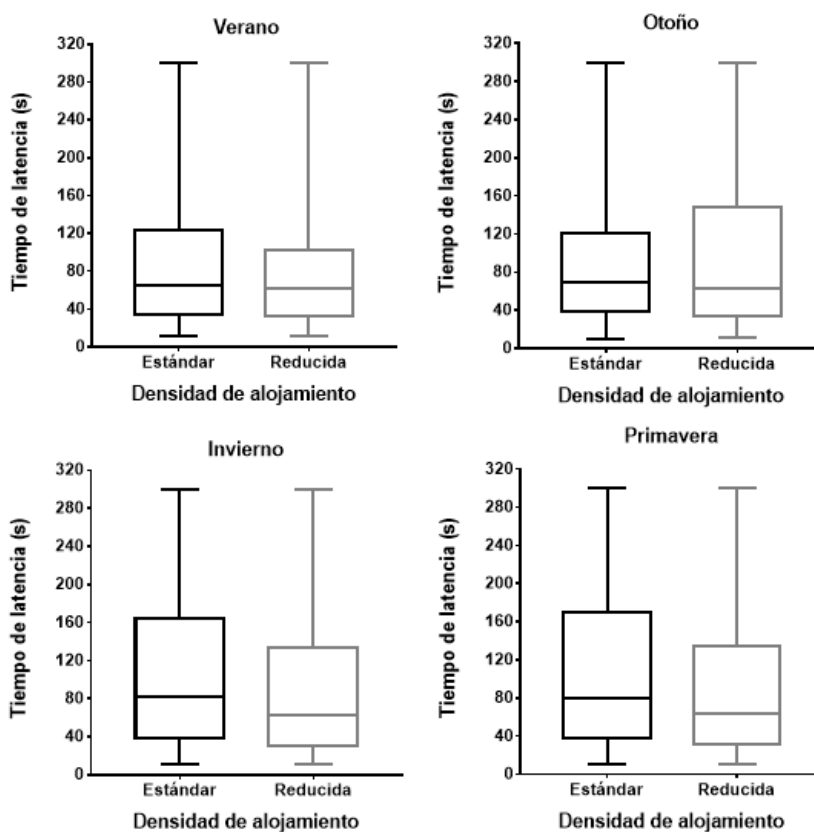


Figura 1. Tiempo de latencia según densidad de alojamiento en cada una de las estaciones del año.

DISCUSIÓN

La inmovilidad tónica es una conducta no aprendida provocada por estímulos de distinto origen, caracterizada por un estado catatónico en el que la capacidad de respuesta se encuentra reducida durante un período de tiempo variable y se la ha interpretado como una respuesta de los vertebrados a la amenaza de predación. Se ha señalado que la inmovilidad tónica mide el nivel de miedo en las aves de corral, por lo que se la utiliza como herramienta para evaluar el bienestar en la producción avícola industrial (9). Teniendo en cuenta que la época del año, el sexo y la densidad de alojamiento influyen en el estado emocional en las aves, en el presente trabajo se hipotetizó que estos factores podrían afectar el período de latencia e intentos de inducción de la inmovilidad tónica en pollos parrilleros, mantenidos en un sistema de producción industrial.

La creciente necesidad de mejorar los índices técnicos en la producción de carne aviar a escala industrial ha llevado al desarrollo de estrategias de manejo tendientes a mejorar la eficiencia del sistema. Entre ellas, el aumento de la densidad de alojamiento ha prevalecido por su factibilidad de aplicación sin aumentos relativos en los costos de producción. En el presente trabajo, el aumento del espacio disponible se tradujo en una disminución del tiempo de latencia junto a un incremento en el número de intentos para lograr la inducción, lo que sugiere que los pollos alojados con mayor espacio presentan una situación mental de mayor equilibrio y una menor reactividad ante un estímulo amenazante. Sin embargo, los resultados de la prueba de inmovilidad tónica que dan cuenta del miedo como una causa de estrés no se reflejaron en mejoras de la producción física obtenida. La práctica de incrementar la densidad de alojamiento con la finalidad de maximizar la rentabilidad es una norma general de manejo de uso rutinario en las granjas de engorde, empleada como herramienta para disminuir costos de producción. En este estudio, se obtuvieron diferencias que confirman este supuesto, dado que la densidad estándar produjo una mayor cantidad de kilogramos de pollo por metro cuadrado que estuvo en el orden del 7 al 10%, a excepción del invierno donde esta diferencia fue menor. Los valores de inmovilidad tónica obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por otros autores para pollos de engorde en sistemas de producción industrial

(10). Uzum y Toplu (11) estudiaron alternativas para disminuir los efectos negativos del estrés térmico, entre las cuales la disminución de la densidad generó menor tiempo de latencia en la prueba de inmovilidad tónica. Tahamtani et al (12) demostraron que la disminución de la densidad y el enriquecimiento del ambiente, mediante colocación de rampas y la provisión de perchas, resultaron en menor tiempo de latencia. Por su parte, Bach et al (13) equipararon el distanciamiento de comederos y bebederos con un aumento de la densidad de alojamiento con mayores valores para la prueba de inmovilidad tónica. El aumento de la densidad provoca reacciones de miedo demostrables también en otros sistemas de producción, pollos criados en jaulas a altas densidades arrojaron mayores valores de inmovilidad tónica (14). Sin embargo, Das y Lacin (15) no observaron mayores valores en el tiempo de latencia de la inmovilidad tónica luego de estudiar dos densidades (12 y 20 pollos/m²) con valores aún mayores que los aplicados en este trabajo. Pollos que fueron alojados a distintas densidades no presentaron diferencias en el tiempo de latencia, pero los que estuvieron a baja densidad pasaron más tiempo de pie, sentados o acostados (16). Campbell et al (17) no observaron diferencias entre grupos de aves que pastoreaban con distinta densidad, mientras que Larsen et al (18) reportaron valores de inmovilidad más altos en gallinas que accedieron menos tiempo al pastoreo comparadas con las de acceso alto. Es así que la reducción en la densidad de alojamiento confiere a los pollos oportunidades para moverse y explorar su entorno, lo que tiene una influencia positiva en su estado mental.

Las pruebas que valoran el miedo han dado resultados contradictorios entre machos y hembras, aunque se presupone que existen diferencias en la tendencia a desarrollar reacciones de miedo entre ambos sexos. Los resultados del presente estudio no demostraron diferencias entre sexos para el tiempo de latencia y el número de intentos de la prueba de inmovilidad tónica, lo cual coincide con Altan et al (10), que no encontraron diferencias entre sexos en dicha prueba en pollos de engorde a los 49 días de edad. Archer (19) estudió el efecto de la genética y el sexo sobre la respuesta de miedo en dos pruebas diferentes y observó un mayor tiempo de latencia y un menor número de intentos en machos, independientemente del genotipo al que pertenecían. En discordancia con nuestros hallazgos, Agnvall et al (20),

trabajaron con la tercera generación del gallo rojo de la selva (antecesor del pollo doméstico) y hallaron valores más altos de tiempo de inmovilidad en las hembras que en los machos y mayor reacción en estas ante la prueba de miedo a los humanos. También Nätt et al (21) señalaron que las hembras permanecieron en inmovilidad un tiempo más prolongado que los machos, a la vez que vocalizaron más e hicieron más intentos de escape en el test de predador, lo que indica que tenían más miedo. Estos autores también observaron que, si bien las hembras fueron más activas, los machos mostraron mayor evidencia de comodidad al perchar y presentar comportamiento de salto/vuelo. Esta diferencia en los roles comportamentales específicos de cada sexo, aunque conocida, no ha sido explicada en sus mecanismos más íntimos de generación.

El mejoramiento genético avícola ha llevado a la obtención de pollos más eficientes desde el punto de vista productivo, pero menos resistentes a las variaciones del entorno, que pueden reflejarse en aspectos relacionados con el estado emocional de las aves, lo que se traduce en una mayor dependencia de estas a un ambiente adecuado. El entorno avícola intensivo es considerado comúnmente como un sistema estresante producto del confinamiento en galpones, lo que hace difícil el ajuste de los factores de confort a las características del clima de la región en que se desarrolla la actividad. Las modernas líneas comerciales de pollos de engorde, mejoradas para un rápido crecimiento, se caracterizan por presentar dificultades a la hora de hacer frente al ambiente adverso, lo que confiere al medio interior del galpón un rol importante en el suministro de condiciones favorables de bienestar. En el presente estudio no se registraron diferencias significativas para la prueba de inmovilidad tónica relacionadas con la estación del año, lo que permite suponer que no tuvo un efecto marcado sobre el estado emocional de los pollos. Skomorucha et al (22) estudiaron los efectos del estrés provocado por la elevada temperatura en el segundo período de crianza de tres genotipos de pollos híbridos sobre la duración de la inmovilidad tónica,

y observaron un mayor tiempo de latencia en uno de los genotipos empleados, lo que sugiere una menor tolerancia de este genotipo a los niveles de bienestar reducido, asociados a la temperatura elevada. Fidan et al (23), asumiendo que los programas de luz pueden constituir un factor de estrés fisiológico para las aves, estudiaron el fotoperíodo y la intensidad de la luz sobre la inmovilidad tónica en pollos híbridos estándar, y no registraron diferencias estadísticas en ninguna de las variables. En un ensayo con valores de temperatura fuera de la zona termoneutral para los pollos de engorde, Egbuniwe et al (24) observaron que la administración de ácido ascórbico redujo la duración de la inmovilidad tónica con respecto a un grupo control.

En conclusión, la duración de la inmovilidad tónica es una herramienta útil como indicador de miedo en situaciones específicas. La disminución de la densidad reduce el período de latencia y aumenta el número de intentos de inducción en pollos en zona tropicales, en tanto que el sexo y la estación del año no producen el mismo efecto.

Comité de ética

La metodología utilizada en los experimentos fue aprobada por el Comité interno para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Centro Regional INTA Santa Fe (protocolo 18-001).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Nagi S.A., a sus trabajadores y a la integración avícola de la Unión Agrícola Avellaneda por facilitarnos el trabajo en sus instalaciones y por su buena predisposición para la realización de nuestra tarea.

REFERENCIAS

1. Mellor DJ. Operational details of the five domains model and its key applications to the assessment and management of animal welfare. *Animals*. 2017; 7(8):60. <https://doi.org/10.3390/ani7080060>
2. Jones RB. Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives. *Worlds Poult Sci J*. 1996; 52(2):131-174. <https://doi.org/10.1079/WPS19960013>
3. Gilman TT, Marcuse FL. Animal hypnosis. *Psychol. Bull.* 1949; 46(2):151-165. <https://doi.org/10.1037/h0060434>
4. Nash RF, Gallup GG. Habituation and tonic immobility in domestic chickens. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1976; 90(9) 870-876. <https://doi.org/10.1037/h0077265>
5. Tong HB, Lu J, Zou JM, Wang Q, Shi SR. Effects of stocking density on growth performance, carcass yield, and immune status of a local chicken breed. *Poult. Sci.* 2012; 91(3):667-673. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01597>
6. Elfving M, Nätt D, Goerlich-Jansson VC, Persson M, Hjelm J, Jensen P. Early stress causes sex-specific, life-long changes in behaviour, levels of gonadal hormones, and gene expression in chickens. *PLoS One*. 2015; 10(5):e0125808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125808>
7. Sinkalu VO. Melatonin modulates tonic immobility and vigilance behavioural responses of broiler chickens to lighting regimens during the hot-dry season. *Physiol. Behav.* 2016; 165:195-201. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.07.019>
8. Jones RB, Faure JM. Sex and strain comparisons of tonic immobility ("righting time") in the domestic fowl and the effects of various methods of induction. *Behav. Process.* 1981; 6(1):47-55. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(81\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0376-6357(81)90015-2)
9. Wang S, Ni Y, Guo F, Fu W, Grossmann R, Zhao R. Effect of corticosterone on growth and welfare of broiler chickens showing long or short tonic immobility. *Comp Biochem Phys A*. 2013; 164(3), 537-543. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.014>
10. Altan O, Seremet C, Bayraktar H. The effects of early environmental enrichment on performance, fear and physiological responses to acute stress of broiler. *Arch. Geflügelkunde*. 2013; 77(1):23-28. <https://www.european-poultry-science.com/The-effects-of-early-environmental-enrichment-on-performance-fear-and-physiological-responses-to-acute-stress-of-broiler,QUIEPTQy>
11. Uzum MH, Oral Toplu HD. Effects of stocking density and feed restriction on performance, carcass, meat quality characteristics and some stress parameters in broilers under heat stress. *Rev Med Vet.* 2013; 164:546-554. https://www.revmedvet.com/2013/RMV164_546_554.pdf
12. Tahamtani FM, Pedersen IJ, Toinon C, Riber AB. Effects of environmental complexity on fearfulness and learning ability in fast growing broiler chickens. *Appl Anim Behav Sci.* 2018; 207:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.04.005>
13. Bach MH, Tahamtani FM, Pedersen IJ, Riber AB. Effects of environmental complexity on behaviour in fast-growing broiler chickens. *Appl Anim Behav Sci.* 2019; 219:104840. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104840>
14. Shields S, Greger, M. Animal welfare and food safety aspects of confining broiler chickens to cages. *Animals*. 2013; 3(2):386-400. <https://doi.org/10.3390/ani3020386>
15. Das H, Lacin E. The effect of different photoperiods and stocking densities on fattening performance, carcass and some stress parameters in broilers. *ISR J VET MED.* 2014; 69(4):211-220. http://www.ijvm.org.il/sites/default/files/different_photoperiods_and_stocking_densities.pdf
16. Son JH. The effect of stocking density on the behaviour and welfare indexes of broiler chickens. *J Agric Sci Technol A.* 2013; 3(4A):307. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2011.38.1.001>

17. Campbell DL, Hinch GN, Downing JA, Lee C. Fear and coping styles of outdoor-preferring, moderate-outdoor and indoor-preferring free-range laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2016; 185:73-77. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.09.004>
18. Larsen H, Hemsworth PH, Cronin GM, Gebhardt-Henrich SG, Smith CL, Rault JL. Relationship between welfare and individual ranging behaviour in commercial free-range laying hens. *Animal.* 2018; 12(11):2356-2364. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000022>
19. Archer G. Sex, genetics and test type affect the responses of chickens to fear testing. *Int Poult Sci.* 2018; 17(7):320-326. <https://doi.org/10.3923/ijps.2018.320.326>
20. Agnvall B, Jöngren M, Strandberg E, Jensen P. Heritability and genetic correlations of fear-related behaviour in red junglefowl—possible implications for early domestication. *PloS One.* 2012; 7(4):e35162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035162>
21. Nätt D, Agnvall B, Jensen P. Large sex differences in chicken behavior and brain gene expression coincide with few differences in promoter DNA-methylation. *PLoS One.* 2014; 9(4):e96376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096376>
22. Skomorucha I, Sosnówka-Czajka E, Muchacka R. Effect of thermal conditions on welfare of broiler chickens of different origin. *Ann Anim Sci.* 2010; 10(4):489-497. <http://www.izoo.krakow.pl/czasopisma/annals/2010/4/art16.pdf>
23. Fidan ED, Nazlıgöl A, Türkyılmaz MK, Aypak SÜ, Kilimci FS, Karaarslan S, Kaya M. Effect of photoperiod length and light intensity on some welfare criteria, carcass, and meat quality characteristics in broilers. *R Bras Zootec.* 2017; 46(3):202-210. <http://doi.org/10.1590/S1806-92902017000300004>
24. Egbuniwe IC, Ayo JO, Kawu MU, Mohammed A. Effects of betaine and ascorbic acid on tonic immobility, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in broiler chickens during the hot-dry season. *J Vet Behav.* 2016; 12:60-65. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.11.001>