



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Impacto da hospitalização no stress em equinos

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professor Doutor Tiago Mendonça, Professora Doutora Gesiane Ribeiro [co-orientador] e Dr. José Prazeres [co-orientador].

Tomás Rafael Maia Rosa Casqueiro

2025

www.ulusofona.pt

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

IMPACTO DA HOSPITALIZAÇÃO NO STRESS EM EQUINOS

Tomás Rafael Maia Rosa Casqueiro

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida por Tomás Rafael Maia Rosa Casqueiro em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 12/09 de 2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 443/2025, de 10 de setembro, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso (FMV-ULusófona)

Vogal: Professor Doutor Mário Cotovio (FMV-ULusófona) - arguente

Orientador: Professor Doutor Tiago Mendonça

Este trabalho também foi orientado pela Professora Doutora Gesiane Ribeiro (co-orientador), Dr. José Prazeres (co-orientador) e Dr. João Borges (orientador externo).

Tomás Rafael Maia Rosa Casqueiro

2025

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona e a todos os docentes por me terem acompanhado durante os 6 anos de curso.

Ao I-MVET pelo financiamento crucial para a realização deste projeto que colmatou na escrita desta dissertação de mestrado.

À Tonin Medicina Desportiva, especialmente ao Dr. Alexandro Giordani e ao Enfermeiro Rodrigo por me terem auxiliado durante os 2 meses de estágio em que estive no Brasil.

A toda a equipa do Hospital Escolar de Equinos da Universidade Lusófona em especial, por me terem formado enquanto bolseiro e enquanto estagiário desta instituição.

Ao Dr. João Borges, por, ao longo destes 4 meses de estágio, ter aceitado ser o meu orientador, e por toda a paciência e gosto que tem em ensinar e passar a mensagem.

Ao meu orientador Professor Doutor Tiago Mendonça por ter estado, desde o início do projeto, disponível para qualquer esclarecimento, pelo auxílio e por me ter guiado nesta dissertação de mestrado.

Aos meus Coorientadores, Professora doutora Gesiane Ferraz e ao Dr. José Prazeres, por se mostrarem sempre disponíveis em ajudar neste projeto.

Ao Professor Doutor Felipe Ramos por me ter auxiliado toda a parte de estatística relacionada com o projeto sendo que o fez com gosto e dedicação.

À minha namorada, que com todo o gosto, paciência e dedicação, mostrou-se 100% disponível neste caminho difícil e que me ajudou bastante em alturas menos boas.

Um agradecimento especial aos meus pais, que, sem eles, e sem o esforço deles, não estaria em vias de defender uma dissertação de mestrado neste curso tão nobre.

À minha avó que esteve sempre presente e disponível para qualquer desabafo e sempre com a capacidade de me fazer distrair das preocupações.

Um obrigado, a toda a família da Beatriz, que tanto no Brasil, como em Portugal, acolheram-me sempre de braços abertos.

A todos os meus amigos dentro e fora da faculdade que, estiveram comigo ao longo destes 6 anos de curso, e que me acompanharam por muitos e muitos anos.

Aos meus equitadores Miguel Carvalho e Cátia Carrilho, por me terem ensinado a gostar e a ter cada vez mais interesse pelo cavalo e pela Arte que é cuidar deste animal.

Resumo

O stress tem vindo a assumir um papel central nos estudos em Medicina Humana e Veterinária, dada a sua influência direta na saúde física e comportamental dos indivíduos. No caso do cavalo, uma espécie que é uma presa por natureza, a suscetibilidade ao stress é particularmente relevante. Alterações rotineiras como transporte, isolamento, mudanças de ambiente ou alimentação constituem fatores potencialmente indutores de respostas de stress agudo ou crónico. Paralelamente, a Medicina Veterinária moderna tem evoluído no sentido da adoção de métodos de diagnóstico e monitorização minimamente invasivos, sendo a análise salivar um exemplo promissor nesse contexto.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto da hospitalização nas respostas fisiológicas e comportamentais de stress em equinos, bem como a sua capacidade de adaptação ao ambiente hospitalar ao longo do tempo. Adicionalmente, procurou-se validar o uso da saliva como método não invasivo para a monitorização de biomarcadores associados ao stress e à inflamação.

Foram avaliados 16 equinos hospitalizados durante um período mínimo de cinco dias, por motivo de doença, lesão ou para realização de procedimentos eletivos. No momento da admissão e da alta hospitalar, foram realizados hemogramas e colhidas amostras biológicas, incluindo saliva, para análise de biomarcadores de stress e inflamação. Paralelamente, ao longo do internamento, procedeu-se à monitorização diária da frequência cardíaca e da variabilidade da frequência cardíaca, parâmetros reconhecidos na avaliação do sistema nervoso autónomo e da resposta ao stress.

Os resultados demonstraram que os cavalos apresentam sinais de stress agudo aquando da admissão, evidenciado pelos parâmetros fisiológicos e hematológicos. Contudo, observou-se uma tendência para estabilização progressiva ao longo dos primeiros dias de hospitalização. Entre os dias 3 e 4 foi registado um aumento de alguns dos parâmetros relacionados com a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) coincidente, na maioria dos casos, com o período pós-cirúrgico — momento que, previsivelmente, representa um pico de desafio fisiológico e psicológico para o animal.

Em suma, este estudo reforça a noção de que a hospitalização é, *per se*, um fator desencadeante de stress nos equinos, ainda que os animais apresentem uma certa capacidade de adaptação ao longo do tempo. Os dados obtidos sustentam também que, no caso do cortisol, a saliva é uma matriz útil para a monitorização do mesmo. Já a serotonina não apresentou

resultados, não sendo possível generalizar esta matriz para biomarcadores de stress. No caso da inflamação, nenhum dos parâmetros avaliados mostrou correlação entre o sangue e a saliva, o que demonstra que, para já a saliva não é um meio fiável para a investigação da inflamação.

Num futuro, poderá ser válida em ambiente clínico, contribuindo para uma abordagem mais ética e menos invasiva na Medicina Veterinária Equina. Ainda assim requer mais investigação sobre o tema.

Palavras-chave: Stress; Inflamação; Saliva; Cavalo;

Abstract

Stress has become a crucial component in both human and veterinary medicine studies, given its direct impact on the physical and behavioural health of individuals. In the case of horses, a species that is prey by nature, the issue of susceptibility to stress is of particular relevance. It is evident that routine changes, encompassing factors such as transport, social isolation, modifications in the environment and dietary shifts have the potential to induce for the onset of acute or chronic stress responses. Concurrently, contemporary veterinary medicine has undergone a transition towards the implementation of minimally invasive diagnostic and monitoring methodologies. In this regard, salivary analysis represents a novel alternative for the assessment of physiological biomarkers.

The primary objective of this study was to assess the impact of hospitalisation on physiological and behavioural stress responses in horses, as well as their ability to adapt to the hospital environment over time. Furthermore, the objective was to validate the use of saliva as a non-invasive method for monitoring biomarkers associated with stress and inflammation.

A total of 16 horses hospitalised due to illness, injury or elective procedures were evaluated over a period of five days. At the time of admission and discharge, blood counts were performed and biological samples, including saliva, were collected for the purpose of analysis of stress and inflammation biomarkers. Concurrently, throughout the period of hospitalisation, daily monitoring of heart rate and heart rate variability was conducted. These parameters are recognised in the assessment of autonomic status and stress response.

The results demonstrated that equines exhibited indications of acute stress upon admission, as substantiated by physiological and haematological parameters. However, a tendency towards progressive stabilisation was observed during the initial period of hospitalisation. An increase in certain HRV-related parameters was observed between days 3 and 4, coinciding with the post-surgical period in most cases. This period is known to represent a peak in physiological and psychological challenges for the animal.

In summary, the present study lends further support to the notion that hospitalisation is, per se, a stress trigger in equines, despite the animals' demonstrated capacity to adapt over time. The data obtained further corroborates the hypothesis that saliva is a viable matrix for the monitoring of cortisol. Conversely, serotonin exhibited no significant outcomes, precluding the generalisation of this matrix to stress biomarkers. In the context of inflammation, the evaluation of various parameters revealed no discernible correlation between blood and saliva. This

finding indicates that, at present, saliva does not serve as a reliable medium for investigating inflammation.

In the future, its validity in a clinical setting is a possibility, with the potential to contribute to an ethical and less invasive approach in equine veterinary medicine. However, further research is required on this subject.

Keywords: Stress, Inflammation, Saliva, Horse.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica;

BE – Bem-estar;

Bpm – Batimentos por minuto;

CRH – Hormona libertadora de corticotrofina;

n.d – do inglês “no date”;

Et al. – E outros, do latim “*el alli*”;

HPA – do inglês “Hypothalamic-Pituitary-Adrenal”;

SAM – do inglês “Sympathetic-Adreno-Medullar”;

IL-6 – Interleucina 6;

MMP-9 – Metaloproteinase de Matriz - 9

FC – Frequência Cardíaca;

VFC – Variabilidade da Frequência Cardíaca;

LF – do inglês “low frequency”;

HF – do inglês “High frequency”;

SDNN – do inglês “Standart deviation of NN intervals”;

RMSSD – Raiz quadrada média das diferenças sucessivas;

PVN – do inglês “Paraventricular Nucleus”;

PFC – do inglês “Pré-frontal Cortex”;

SNC – Sistema Nervoso Central;

EIS – Estímulos indutores de stress;

VLF – do inglês “Very low frequency”;

Índice Geral

INTRODUÇÃO	17
1.1 O CAVALO E A SUA ORIGEM	17
1.2. O MUNDO VISTO PELO AVALO	17
1.3. O CAVALO HOSPITALIZADO.....	18
1.4. O STRESS E O SEU IMPACTO	19
1.5. FISIOLOGIA DA RESPOSTA AO STRESS.....	21
<i>1.5.1. Sistema HPA</i>	<i>22</i>
<i>1.5.2. Sistema SAM.....</i>	<i>22</i>
<i>1.5.3. Sistema Límbico.....</i>	<i>22</i>
1.6. DIAGNÓSTICO DE STRESS/INFLAMAÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS:	29
2.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO:	29
2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, DE NÃO INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO:	29
2.3. METODOLOGIA:.....	29
<i>2.3.1. Amostras de sangue, saliva:</i>	<i>30</i>
<i>2.3.2. Variabilidade da frequência cardíaca:.....</i>	<i>31</i>
<i>2.3.3. Análise de Biomarcadores:.....</i>	<i>31</i>
<i>2.3.4. Análise estatística.....</i>	<i>32</i>
RESULTADOS.....	34
3.1. RESULTADOS DO HEMOGRAMA:	34
3.2. CORRELAÇÕES E EVOLUÇÃO DOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS E SALIVARES:	36
3.3. RESULTADOS DOS DADOS CARDÍACOS:	37
3.4. CORRELAÇÕES DE PARÂMETROS DIVERSOS:.....	41
DISCUSSÃO:	43
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	51
ANEXOS.....	78

Índice de Figuras

FIGURA 1: CRONOGRAMA DE RECOLHA DE DADOS FISIOLÓGICOS E DADOS COMPORTAMENTAIS.

(D.F. – DADOS FISIOLÓGICOS; D.C. – DADOS COMPORTAMENTAIS; T0 – ADMISSÃO DO EQUINO; T1 – 2º DIA DE RECOLHA DE DADOS; T2 – 3º DIA DE RECOLHA DE DADOS; T3 – 4º DIA DE RECOLHA DE DADOS; T430

FIGURA 2 : COLOCAÇÃO DO APARELHO EQUIMETRE®. 1- LADO DIREITO DO CAVALO; 2- LADO ESQUERDO DO CAVALO; A-POSIÇÃO DO LEITOR DE MICROCHIPS E ARMAZENADOR DE

DADOS; B- ELETRODOS31

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1: % DAS ÁREAS ABRANGIDAS	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
GRÁFICO 2: % DE CONSULTAS INTERNAS VS AMBULATÓRIO	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
GRÁFICO 3: % DAS ÁREAS ABRANGIDAS NO HOSPITAL ESCOLAR DE EQUINOS EM SANTO ESTEVÃO	16
GRÁFICO 4: % DE CONSULTAS INTERNAS VS AMBULATÓRIO NO HOSPITAL ESCOLAR DE EQUINOS DE SANTO ESTEVÃO	16
GRÁFICO 5 EVOLUÇÃO DOS LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E LINFÓCITOS ENTRE O DIA 1 E DIA 5.	34
GRÁFICO 6: EVOLUÇÃO DOS RÁCIOS LEUCÓCITOS/PLAQUETAS E NEUTRÓFILOS/PLAQUETAS ENTRE O DIA 1 E O DIA 5	35
GRÁFICO 7: EVOLUÇÃO DOS RÁCIOS LEUCÓCITOS/VPM, NEUTRÓFILOS/VPM E LINFÓCITOS/VPM ENTRE O DIA 1 E O DIA 5.....	36
GRÁFICO 8: CORRELAÇÃO DO CORTISOL NO DIA 5	37
GRÁFICO 9: CORRELAÇÃO DA IL6 NO DIA 1	37
GRÁFICO 10: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA AO LONGO DOS 5 DIAS	38
GRÁFICO 11: AVALIAÇÃO DA MÉDIA RR AO LONGO DOS 5 DIAS	38
GRÁFICO 12: AVALIAÇÃO DO SDNN AO LONGO DOS 5 DIAS.....	39
GRÁFICO 13: AVALIAÇÃO DO RMSSD AO LONGO DOS 5 DIAS	39
GRÁFICO 14: AVALIAÇÃO DO LF AO LONGO DOS 5 DIAS	40
GRÁFICO 15: AVALIAÇÃO DO HF AO LONGO DOS 5 DIAS.....	40
GRÁFICO 16: AVALIAÇÃO DO VLF AO LONGO DOS 5 DIAS	41
GRÁFICO 17: AVALIAÇÃO DO RÁCIO LF/HF AO LONGO DOS 5 DIAS.....	41
GRÁFICO 18: CORRELAÇÃO ENTRE MMP-9 E LF NO DIA 1	42
GRÁFICO 19: CORRELAÇÃO ENTRE OS LEUCÓCITOS E NEUTRÓFILOS NO DIA 1	42

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: EFEITOS DO USO DE DIFERENTES TIPOS DE ANESTÉSICOS NO EIXO HPA.....	19
<i>TABELA 2: OS VÁRIOS PARÂMETROS CARDÍACOS E A SUA RESPOSTA AO STRESS EM CAVALOS.....</i>	<i>25</i>

Relatório de estágio:

O estágio teve a duração de 6 meses, e foi realizado num período de 2 meses na Tonin Medicina Desportiva, na orientação do Dr. Alexandro Giordani, e 4 meses no Hospital Escolar de Equinos de Santo Estevão sob orientação do Dr. João Borges.

A Tonin Medicina Desportiva, é sediada em Curitiba, Paraná, e é uma clínica integrada na Sociedade Hípica Paranaense, sede da Federação Paranaense de Hipismo. Esta clínica é responsável pela parte médico-veterinária de toda a Sociedade Hípica, com cerca de 250 cavalos. Diariamente são observados 15 a 20 cavalos sendo que a casuística se baseia na profilaxia dos cavalos residentes, realização de consultas ortopédicas, visto serem cavalos de alto rendimento, mas também realizam outros procedimentos, como orquiectomia, remoções dentárias, exames pré-compra e também o acompanhamento em ambulatório. O autor, teve a oportunidade de auxiliar na realização de exames radiológicos e ultrassonográficos, como também ajudar nas consultas ortopédicas e em todos os outros procedimentos referidos anteriormente. Durante este estágio, o autor acompanhou cavalos ao BH Festival, uma prova em São Paulo, com a presença 2500 cavalos e também auxiliar a equipa veterinária nas várias provas realizadas na Sociedade Hípica Paranaense. Esta clínica tem também um bloco de reabilitação equipado com aparelho de Laser, “Shockwave”, equipamento de campos eletromagnéticos pulsados, aparelho de ultrassonoterapia, passadeira aquática e passadeira elétrica, sendo que o autor teve a oportunidade de trabalhar com todos estes equipamentos.

Casuística: Tonin Medicina Desportiva

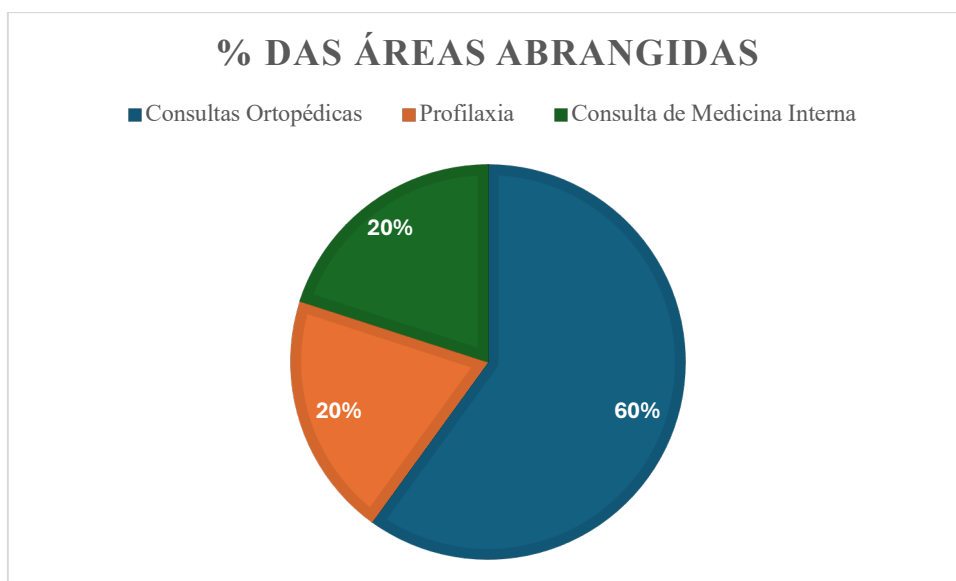


Gráfico 1: % das áreas abrangidas

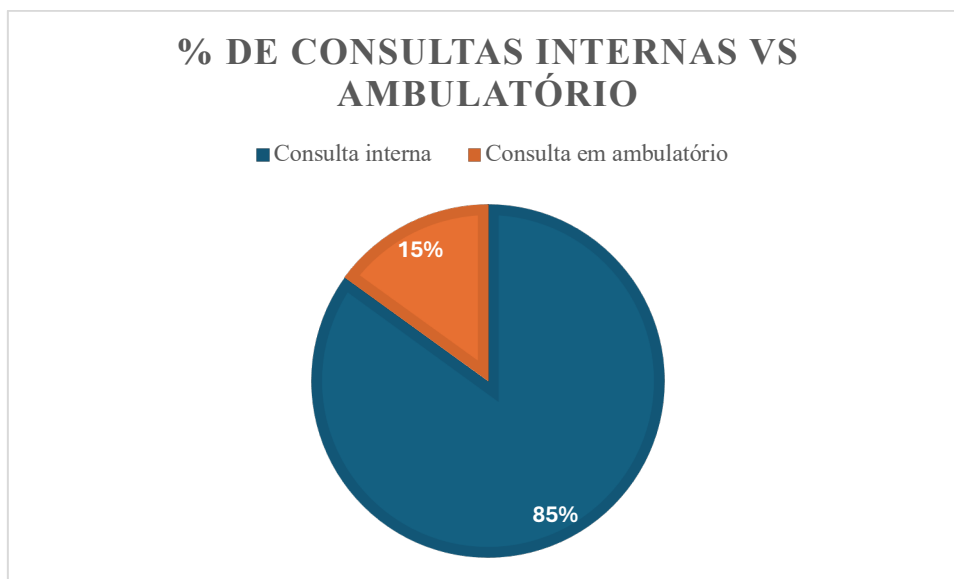


Gráfico 2: % de consultas internas VS ambulatório

O Hospital Escolar de Equinos de Santo Estevão é sediado em Santo Estevão, Portugal, sendo o polo de equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. Este hospital conta com 9 boxes, sendo 4 boxes de internamento, 2 boxes de cuidados intensivos, 1 maternidade, 1 boxe para casos infetocontagiosos devidamente equipada e 1 boxe para casos neurológicos. Conta ainda com 2 boxes de indução, 1 bloco cirúrgico devidamente equipado para cirurgias de tecidos moles e artroscopia. Tem 2 salas de consulta, sendo que a sala de consulta 2 está equipada com um ecógrafo fixo e um portátil muitas vezes utilizado nos serviços de ambulatório, e também tem um equipamento de radiografia totalmente digital. Esta instalação tem ainda um robot edamis que realiza tomografia computadorizada (TC), radiografia e fluoroscopia em cavalos em estação. O hospital tem presente uma sala laboratorial onde se encontram o equipamento de hemograma, de bioquímicas, de fibrinogénio e microscópio ótico. Ao longo dos 4 meses em estágio, o autor teve a oportunidade de familiarizar-se com a rotina hospitalar, auxiliando a restante equipa no tratamento dos cavalos internados. Participou em cirurgias tais como: orquiectomia, cólica cirúrgica, redução de fraturas, cirurgias oftálmicas e artroscopias. O autor ajudou ainda em exames radiográficos, exames ecográficos e em consultas ortopédicas. Participou em consultas de ambulatório dadas pelos vários médicos veterinários afiliados ao hospital. Este autor teve a oportunidade de observar e auxiliar em exames pré-compra. Realizou ainda colheitas de sangue, colocação de cateteres e administração de medicações, sempre com supervisão de superiores. Neste hospital, o autor teve contacto com 306 casos.

Casuística: Hospital Escolar de Equinos de Santo Estevão

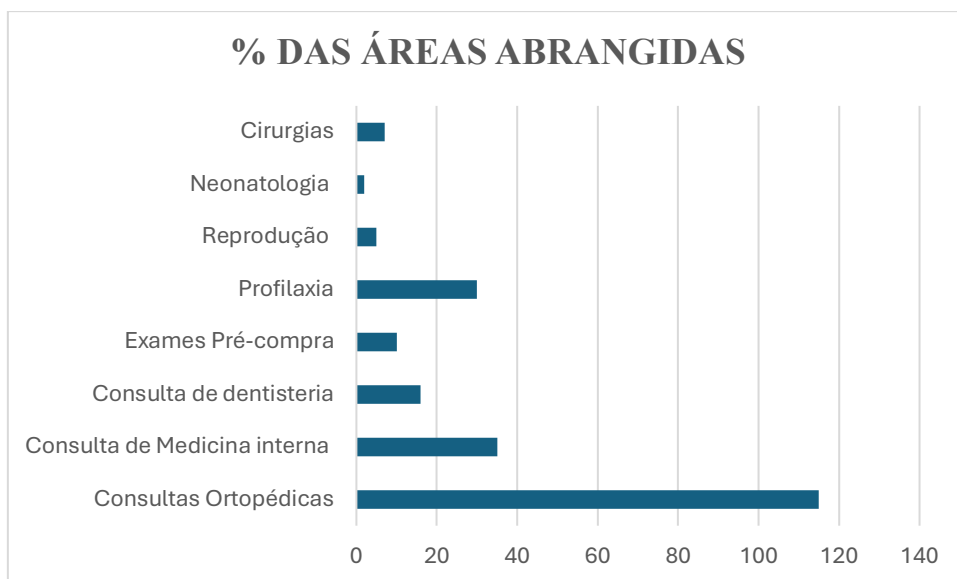


Gráfico 3: % das áreas abrangidas no hospital escolar de equinos em santo estevão

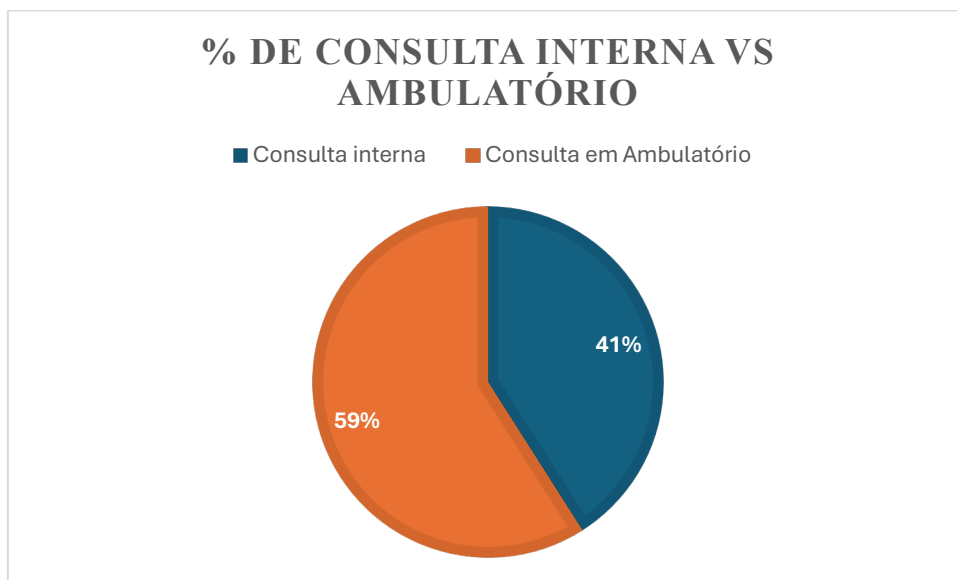


Gráfico 4: % de consultas internas VS ambulatório no hospital escolar de equinos de Santo Estevão

Introdução

Ao contrário dos predadores, em que a exploração está bastante ligada aos seus instintos, nos animais considerados presas, a sua sobrevivência depende menos da tendência do animal para explorar (Christensen *et al.*, 2005). Como presas que são, os cavalos nascem com respostas instintivas de defesa, que lhes proporcionam vantagens de sobrevivência (B. Riley *et al.*, 2022).

1.1 O Cavalo e a sua Origem

Equus Ferus Cabalus mais conhecido como cavalo, é hoje utilizado para a agricultura, transporte, lazer e desporto (Desta, 2023; Klecel & Martyniuk, 2021; Muhammad, 2024) Estes animais foram domesticados há cerca de 5500 anos, e por terem sido considerados espécies pecuárias, foram dos últimos a ser considerados domésticos (Librado *et al.*, 2016, 2017).

Ao longo do tempo, o equino foi integrado nas sociedades indígenas, tendo sido um fator primordial na sua evolução social e ecológica (Timothy Treal). A domesticação dos cavalos também permitiu a realização de percursos de longo curso e foi um grande contributo para as guerras, no entanto, a sua evolução foi de tal forma abrupta que geneticamente, os cavalos da atualidade não descendem da linhagem mais antiga conhecida aos dias de hoje, associada a atrelagem, ordenhas e carne, mas sim de subespécies da eurásia ocidental que acabaram por substituir as populações mais ancestrais (Librado *et al.*, 2021).

1.2. O Mundo visto pelo cavalo

Os cavalos constroem memórias através de interações passadas influenciando assim as suas respostas futuras. Desta forma, uma experiência positiva ou negativa com o humano pode ser generalizada para novas (Fureix *et al.*, 2009). Estes animais têm também a capacidade de compreender sinais como expressões faciais ou mesmo o tom de voz de um humano, tendo assim uma vantagem na orientação do seu comportamento para situações novas e/ou potencialmente perigosas, sendo uma forma de decidir uma aproximação ou afastamento de um determinado ser humano, num determinado contexto (Schrimpf *et al.*, 2020).

Apesar da domesticação ter reduzido o risco de predação, os cavalos mantêm uma resposta de auto perseverança face aos predadores, mesmo que atenuada relativamente aos seus antecessores (Janczarek *et al.*, 2020, 2021). É ainda possível, que estes animais consigam reconhecer e distinguir entre sinais de ameaça real e sinais sem relevância (Janczarek *et al.*, 2021).

Atualmente, muitos dos cavalos estão confinados a alojamentos em boxe, em paddoks e mesmo a campo. Situações como a mudança do ambiente, podem muitas vezes gerar um aumento de respostas de stress, entre as quais se salienta a apatia e comportamentos estereotipados (Bruschetta *et al.*, 2024; Poochipakorn *et al.*, 2024). Animais com tais sinais, beneficiam de uma rotina de trabalho, socialização e acesso a forragem constante (Ruet *et al.*, 2019). Estes comportamentos são muitas vezes associados com stress agudo, uma vez que, quando os cavalos voltam de um concurso, têm alta clínica, ou mesmo quando já se adaptaram a um novo ambiente, normalmente retornam ao seu comportamento normal (Oliveira *et al.*, 2025).

1.3. O cavalo Hospitalizado

Habitualmente, a mudança do cavalo do seu ambiente de vida para um ambiente hospitalar altera os padrões de descanso do animal, podendo reduzir a frequência e a qualidade do mesmo (Oliveira *et al.*, 2025). Tal alteração ocorre devido a uma resposta neuroendócrina associada ao stress, que acaba por afetar a homeostase do sono e do seu ciclo (Lo Martire *et al.*, 2020; Van Reeth *et al.*, 2000). Esta alteração pode levar a uma disrupção da arquitetura do sono e do ciclo circadiano, que por sua vez pode levar a um sono instável e insuficiente (Lo Martire *et al.*, 2020; Van Reeth *et al.*, 2000).

O cavalo hospitalizado sofre frequentemente de dor, de desconforto, de fadiga e de frustração, em parte devido a uma incapacidade de demonstrar comportamentos naturais, quer seja pela mudança de ambiente quer seja pelas lesões que os impossibilitem de se comportar naturalmente (Lesimple, 2020). O stress e o medo relacionados a procedimentos clínicos estão entre os fatores mais frequentes e de maior risco para o bem-estar (BE) dos animais, podendo então levar a um aumento do tempo de recuperação e risco na segurança, tanto do cavalo como de toda a equipa hospitalar (Carroll *et al.*, 2022; Rioja-Lang *et al.*, 2020).

A resposta natural do organismo ao trauma do tecido envolvido em procedimentos cirúrgicos leva a uma ativação do eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (HPA), e, consequentemente, a um aumento de ACTH e de cortisol circulante (Feng *et al.*, 2024; Lai Carlo, 2015; Roth-Isigkeit *et al.*, 2000). Além da própria hospitalização e dos procedimentos cirúrgicos, também a anestesia pode despoletar um aumento de cortisol, da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e ainda mudanças nos níveis de glucose sanguínea e outros marcadores metabólicos (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Taylor, 1989). O procedimento de anestesia, pode levar a uma supressão ou ativação do eixo HPA, devido à interação dos fármacos

com o organismo, (Tabela 1; Besnier *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2024). No que toca à anestesia local/regional, quando administrada previamente à cirurgia, consegue reduzir a nociceção espinhal e também a ativação do eixo HPA, demonstrada pela estabilidade dos níveis de ACTH e de cortisol no decorrer e após a cirurgia (R. Kim, 2018; Lykkegaard *et al.*, 2005).

Tabela 1: Efeitos do uso de diferentes tipos de anestésicos no eixo HPA

Tipo de anestesia	Efeitos no eixo HPA
Anestesia volátil	Ativação do eixo HPA (R. Kim, 2017, 2018)
Opioides	Ativação do eixo HPA (R. Kim, 2017, 2018)
Anestesia regional/local	Supressão do eixo HPA (R. Kim, 2018; Lykkegaard <i>et al.</i> , 2005)

Os fatores de stress observados nos cavalos internados contribuem para o desenvolvimento de inflamação ou para um prolongamento/agravamento dos processos inflamatórios, ocorrendo muitas vezes, como noutras espécies, o leucograma de stress (Schmucker *et al.*, 2022). Nos cavalos, este padrão, que é reconhecido por uma neutrofilia marcada, eosinopenia, linfopenia e uma ligeira monocitose, está muitas vezes associado ao aumento do cortisol, um marcador bastante utilizado no que toca à identificação do stress agudo (Martín-Cuervo *et al.*, 2022; Schmucker *et al.*, 2022; Villalba-Orero *et al.*, 2024).

1.4. O Stress e o seu impacto

Em medicina humana, a organização mundial de saúde caracteriza o stress como sendo um estado de preocupação e de sobrecarga psicológica causado por uma ou várias situações difíceis (WHO, 2023). Por outro lado, em medicina veterinária, o stress é muitas vezes definido pela dificuldade de um animal se adaptar a um constrangimento físico e/ou ambiental (Astruc & Terlouw, 2023).

Nos seres humanos e nos animais, a homeostase é significativamente afetada por perturbações fisiológicas e instabilidades moleculares decorrentes de vários fatores de stress (Galluzzi *et al.*, 2018). Assim constata-se um impacto negativo na produtividade, saúde psicológica e BE social (Dhama *et al.*, 2019). Os estímulos que desencadeiam o processo de stress são designados estímulos indutores de stress (EIS), e o conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais em resposta à exposição a estes EIS constitui a resposta ao stress (Chu *et al.*, 2025).

A resposta de stress é inicialmente considerada aguda, mas, se persistir no tempo, pode adquirir um carácter crónico, não estando bem definida a transição entre o estado agudo e crónico (Rohleder, 2019; Smyth *et al.*, 2013).

Por definição, o stress agudo é uma resposta imediata, de curta duração a um certo evento ou ameaça (Agorastos & Chrousos, 2022; Dhabhar & Mcewen, 1997; Musazzi *et al.*, 2017; Rohleder, 2019). Esta resposta aumenta certas funções imunitárias, como por exemplo, a imunidade mediada por células, promovendo um aumento de leucócitos em circulação (Dhabhar & Mcewen, 1997). A resposta de stress aguda é frequentemente uma resposta adaptativa e benéfica, ao contrário da resposta de stress crónico (Agorastos & Chrousos, 2022).

O stress crónico é composto por uma exposição repetida ou prolongada a EIS que desencadeia uma ativação do sistema de resposta ao stress, podendo levar a uma sobrecarga dos mecanismos reguladores do organismo (Baum, 1990; Senanayake & Arambepola, 2019; Smyth *et al.*, 2013). Consequentemente, o stress crónico induz apresentações clínicas variáveis, desde respostas compensatórias a problemas psicológicos e físicos (Agorastos & Chrousos, 2022; Musazzi *et al.*, 2017; Rohleder, 2019; Smyth *et al.*, 2013). Assim, ao contrário do stress agudo, este processo crónico acaba por suprimir a função imunitária levando a uma vulnerabilidade para a saúde, sobretudo doenças infecciosas (Agorastos & Chrousos, 2022; Dhabhar & Mcewen, 1997). Está ainda fortemente associado a estados depressivos em humanos, alterando cronicamente o estado fisiológico (Agorastos & Chrousos, 2022; Hammen *et al.*, 2009; McGonagle & Kessler, 1990; Smyth *et al.*, 2013)

No caso dos cavalos, como referido anteriormente, sendo animais muito suscetíveis ao stress existem alguns fatores a considerar. A mudança de ambiente, e a exposição a ambientes desconhecidos é muitas vezes um fator que pode aumentar o nível de marcadores de stress, mesmo quando não existe nenhuma mudança comportamental perceptível (Bazzano *et al.*, 2024; Górecka-Bruzda *et al.*, 2025; Pawluski *et al.*, 2017). O isolamento destes animais, por exemplo, em transporte, em prova, ou mesmo em boxe num hospital, é um fator importante de stress agudo, podendo levar a um aumento da tensão muscular, comportamentos relacionados com o stress e algumas mudanças fisiológicas (Górecka-Bruzda *et al.*, 2025; Rankins *et al.*, 2022). Procedimentos como o casqueamento/ferração dos cascos, simples contenção ou mesmo tratamentos veterinários, são também uma fonte de stress principalmente em cavalos com pouco maneio, como por exemplo em éguas de reprodução e poldros (Górecka-Bruzda *et al.*, 2025; Pearson *et al.*, 2021). A maioria dos cavalos de alto rendimento também apresentam, por vezes, algumas alterações fisiológicas, como por exemplo, o aumento da frequência cardíaca (FC), da

temperatura ocular e de comportamentos de stress, sendo que, fatores intrínsecos (como a idade ou mesmo a raça), e fatores extrínsecos (como a duração de viagem e o tipo de prova), podem ter uma influência significativa nestas manifestações (Bartolomé *et al.*, 2013; De Santis *et al.*, 2017; König *et al.*, 2017). Está também descrito que qualquer tipo de lesão, doença, dor aguda/crónica pode ativar as vias de resposta ao stress incluindo hormonais, por exemplo a alteração dos níveis de cortisol e de catecolaminas, e também respostas comportamentais originando algumas estereotipias, estando estas mais ligadas a cronicidade (Scholler *et al.*, 2023; Wagner, 2010).

O stress em equinos tem um impacto bastante importante nos mecanismos pró-inflamatórios do organismo (Arfuso *et al.*, 2023; Arrigo *et al.*, 2024; Macnicol *et al.*, 2018). Esta descrito que, nestes animais, o stress agudo aumenta marcadores inflamatórios como as interleucinas (IL-6), sendo o pico 30 a 90 minutos após o estímulo de stress ter ocorrido (Marsland *et al.*, 2017; Steptoe *et al.*, 2007). Em equinos está descrito que depois de um transporte, se pode observar o aumento da contagem das células brancas, de cortisol, da proteína C-reativa (CRP) e de proteínas pró-inflamatórias, como por exemplo, as globulinas, indicando assim um estado pré-inflamatório e de ativação do sistema imune quando o cavalo é sujeito a um fator de stress (Arfuso *et al.*, 2023; Arrigo *et al.*, 2024; A. B. Miller *et al.*, 2021). O exercício de alta intensidade, pode também favorecer o aumento exponencial dos fatores inflamatórios normalmente no prazo de 30 minutos (Macnicol *et al.*, 2018).

Assim, os cavalos tendem a recuperar de um episódio de stress agudo num dia, mas, se nesse período ou num período maior o EIS se mantém ativo, o animal fica suscetível a condições de mal-estar ou mesmo a doença (Arrigo *et al.*, 2024; A. B. Miller *et al.*, 2021).

1.5. Fisiologia da resposta ao stress

A resposta ao estímulo de stress centra-se em três sistemas: HPA; SAM; sistema límbico (Chu *et al.*, 2025; Godoy *et al.*, 2018; Herman *et al.*, 2005). Ativado pelo stress, o eixo HPA, leva a um aumento de glucocorticoides ajudando não só na mobilização de energia, como também, na modulação de vários sistemas orgânicos (Godoy *et al.*, 2018; Herman *et al.*, 2016). O sistema Simpático-Adreno-Medular (SAM) é responsável por uma resposta rápida e inicial ao stress, libertando catecolaminas, o que leva a uma preparação do corpo para a ação imediata (Brunyé *et al.*, 2025; Godoy *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2020). Já o sistema límbico, é composto por algumas estruturas que integram informações emocionais e modula tanto o HPA como o SAM (Godoy *et al.*, 2018; Herman *et al.*, 2016; Radley & Johnson, 2018).

1.5.1. Sistema HPA

O sistema HPA exerce a sua resposta através da ativação do eixo HPA ocorrendo a liberação da hormona libertadora de corticotropina (CRH) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) para a circulação (Chu *et al.*, 2025). Quando a CRH se liga aos recetores CRH-1 e CRH-2 na hipófise, esta produz e liberta ACTH, sendo que a liberação dessa hormona pelo portal hipofisário leva a uma estimulação da *fasciculata* (camada média da glândula adrenal) ocorrendo a produção e secreção de glucocorticoides (Godoy *et al.*, 2018). Estes, por feedback negativo, ligam-se maioritariamente a recetores no hipotálamo, inibindo a liberação de CRH e ACTH e prevenindo uma ativação descompensada deste sistema (Herman *et al.*, 2016; Joseph & Whirledge, 2017; Russell *et al.*, 2018). Estas hormonas têm uma ação multiorgânica tendo a capacidade de mobilizar energia, modular respostas imunes, metabólicas e comportamentais (Herman *et al.*, 2016; Joseph & Whirledge, 2017).

1.5.2. Sistema SAM

Quando o SAM é ativado, desencadeiam-se vias de sinalização (Brunyé *et al.*, 2025; Trevelyan *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2020). Molecularmente, este sistema ativa a medula, originando uma liberação de epinefrina e norepinefrina, iniciando a típica resposta de luta ou fuga associada ao aumento da FC, ao aumento da pressão sanguínea, e à liberação de energia armazenada (Brunyé *et al.*, 2025; Jayasinghe *et al.*, 2022; Turner *et al.*, 2020).

1.5.3. Sistema Límbico

As estruturas límbicas são um importante modulador do HPA, uma vez que, essas estruturas conseguem inibir ou intensificar a sua atividade (Herman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2021).

Dessas estruturas, o hipocampo e o córtex pré-frontal (PFC) atuam nomeadamente a favor da inibição deste sistema reduzindo a liberação de ACTH e de glucocorticoides induzidas por stress (Radley & Sawchenko, 2011). Estas duas estruturas têm uma ligação direta com os neurónios de saída do HPA no PVN do hipotálamo (Cole *et al.*, 2022; Radley & Sawchenko, 2011; Smulders, 2021). Essa resposta é modulada por recetores de glucocorticoides fornecendo um feedback em resposta à quantidade de hormonas de stress circulantes (Cole *et al.*, 2022; Jacobson & Sapolsky, 1991).

A amígdala é outra estrutura límbica responsável por modular a resposta do eixo HPA, mas, neste caso, ao contrário das estruturas referidas acima, tem por função habitual aumentar a atividade do eixo HPA, promovendo uma maior excreção de glucocorticoides. Este aumento, deve-se ao facto dos núcleos central e basolateral (constituintes da amígdala), fornecerem um estímulo excitatório ao eixo HPA, principalmente através de vias indiretas, acabando por haver uma estimulação dos neurónios responsáveis pela produção e excreção da CRH, no PVN do hipotálamo (Herman *et al.*, 2020; Weidenfeld & Ovadia, 2017). Parte desse estímulo excitatório, deve-se a neurotransmissores presentes na amígdala, como por exemplo, a serotonina e a norepinefrina que ajudam na ativação do eixo HPA, havendo lesão ou depleção destes neurotransmissores, as respostas ao stress vão ser menos eficazes uma vez que ambos contribuem para capacidade de adaptação ao EIS (Weidenfeld & Ovadia, 2017).

1.6. Diagnóstico de Stress/Inflamação

O diagnóstico de stress e de inflamação implica uma abordagem rigorosa e sustentada por testes laboratoriais e físicos (Davis *et al.*, 2023; Ge *et al.*, 2022; Montgomery *et al.*, 2024).

O cortisol é uma hormona esteróide produzida pelas glândulas adrenais, sendo um mediador importante na resposta ao stress, com uma secreção circadiana bem descrita, tendo o pico da sua concentração no início do dia, seguindo-se um declínio gradual ao longo do mesmo (Knezevic *et al.*, 2023; Kusov *et al.*, 2023; McEwen, 2019; Vignesh *et al.*, 2024). O valor desta hormona num equino adulto, vai desde os 12ng/mL até 158,3ng/mL (James *et al.*, 1970; Sikorska *et al.*, 2023). Existem vários métodos de medição de cortisol, entre eles, o cortisol do soro ou plasma, muito utilizado para avaliar o stress agudo, que, apesar da sua utilização frequente, implica uma colheita de amostras por métodos invasivos (Hovey *et al.*, 2021; Peeters *et al.*, 2011; Share *et al.*, 2024; Sikorska *et al.*, 2023). O cortisol salivar, é outro método utilizado na medição de cortisol, útil para monitorizar o stress agudo e prático no que toca a amostragens repetidas ou no terreno (Aurich *et al.*, 2015; Peeters *et al.*, 2011; Sikorska *et al.*, 2023; Strzelec *et al.*, 2011). É um método não invasivo refletindo assim o cortisol livre (ativo) apresentando boas relações com o cortisol sérico (Aurich *et al.*, 2015; Peeters *et al.*, 2011; Sikorska *et al.*, 2023; Strzelec *et al.*, 2011). Apesar de ser um excelente marcador, os seus níveis podem ser influenciados por vários fatores, tais como, a altura do dia, estado reprodutivo, manejo, exercício e pelo protocolo de colheita (Aurich *et al.*, 2015; Sikorska *et al.*, 2023; Strzelec *et al.*, 2011). Além disso, muitas vezes não existe uma correlação entre esta hormona e as estereotipias observadas sendo que, no stress crónico o cortisol pode estar tanto diminuído quanto aumentado

dificultando a interpretação dos resultados (Hovey *et al.*, 2021; Pawluski *et al.*, 2017). Apesar de várias limitações existem, atualmente, no mercado diversos kits de análise de imunoabsorção enzimática (ELISA) e métodos analíticos avançados que melhoram a fiabilidade e acessibilidade da medição deste parâmetro (Cerasoli *et al.*, 2022; Share *et al.*, 2024).

A serotonina é considerada um neurotransmissor e neuromodulador que atua sobretudo no Sistema Nervoso Central (SNC), apresentando também algumas funções periféricas (Choi *et al.*, 2020; De Deurwaerdère & Di Giovanni, 2020; Kanova & Kohout, 2021; Olivier, 2015; Pourhamzeh *et al.*, 2022). Este neurotransmissor é sintetizado a partir do triptofano e, por não ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, resulta em reservatórios centrais e periféricos independentes (Choi *et al.*, 2020; Kanova & Kohout, 2021). Os níveis plasmáticos deste neurotransmissor diferem bastante entre estudos uma vez que o número de cavalos, raça, e testes utilizados foram diferentes, não havendo ainda a possibilidade de quantificar um intervalo aceitável dos níveis basais desta molécula (Ayala *et al.*, 2012; Bruschetta *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2024; J. Kim *et al.*, 2021; Lee & Yoon, 2021). Apesar disso, estudos comparativos demonstram que cavalos expostos a situações de stress, como dor, doença ou transporte, apresentam níveis de serotonina mais baixos (Ayala *et al.*, 2012; Bruschetta *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2024). Ao nível do SNC, a serotonina influencia o humor, cognição, ansiedade, memória, aprendizagem, sono e também a resposta ao stress, sendo que, fora deste sistema, a serotonina funciona como uma hormona e fator de coagulação, ajudando na regulação cardiovascular, gastrointestinal, na regulação circulatória e na absorção de glucose (Choi *et al.*, 2020; De Deurwaerdère & Di Giovanni, 2020; Jonnakuty & Gragnoli, 2008; Kanova & Kohout, 2021; Madrigal-Trejo *et al.*, 2023; Olivier, 2015; Pourhamzeh *et al.*, 2022). Os cavalos, quando expostos a EIS agudos, tais como o transporte, mostram uma diminuição dos níveis sanguíneos de serotonina com o aumento da expressão dos seus recetores nas células sanguíneas (Bruschetta *et al.*, 2024). Sendo estas alterações maioritariamente acompanhadas por aumento de cortisol e de outros parâmetros relacionados com o stress poderá ser possível afirmar que a alteração serotoninérgica reflete o estado de stress do animal (Bruschetta *et al.*, 2024). Em equinos com dor crónica, por exemplo com osteoartrite, as concentrações plasmáticas de serotonina apresentam-se diminuídas quando comparadas com cavalos saudáveis, sendo que esses níveis permanecem alterados ao longo do tratamento de controlo da dor, o que indica que a serotonina pode servir como um biomarcador do stress induzido pela dor (Costa *et al.*, 2024).

Alguns parâmetros cardíacos (Tabela 2: *Os vários parâmetros cardíacos e a sua resposta ao stress em cavalos*) são também utilizados como auxílio ao diagnóstico de stress (Rudics *et al.*, 2025)

Tabela 2: Os vários parâmetros cardíacos e a sua resposta ao stress em cavalos (FC-Frequência cardíaca; Média RR-média dos intervalos RR; SDNN-desvio padrão dos intervalos NN; RMSSD-raiz quadrada média das diferenças sucessivas; LF-banda de baixa frequência; HF-banda de alta frequência;)

Parâmetros Cardíacos	Resposta ao Stress em cavalos
FC	Aumenta (Bartolomé <i>et al.</i> , 2013; Rietmann <i>et al.</i> , 2004)
Média RR	Diminui (Gehlen, Faust, <i>et al.</i> , 2020;)
SDNN/RMSSD	Diminui (Gehlen, Faust, <i>et al.</i> , 2020; Górecka-Bruzda <i>et al.</i> , 2025)
LF	Aumenta (Gehlen, Faust, <i>et al.</i> , 2020; Gehlen, Loschelder, <i>et al.</i> , 2020; Rietmann <i>et al.</i> , 2004)
HF	Diminui (Gehlen, Faust, <i>et al.</i> , 2020; Gehlen, Loschelder, <i>et al.</i> , 2020; Rietmann <i>et al.</i> , 2004)
Rácio LF/HF	Aumenta (Gehlen, Faust, <i>et al.</i> , 2020; Gehlen, Loschelder, <i>et al.</i> , 2020; Rietmann <i>et al.</i> , 2004)

Devido à ação do SAM num episódio de stress e ou excitação, a FC aumenta, sendo assim um indicador direto para estes dois parâmetros (Bartolomé *et al.*, 2013; Rietmann *et al.*, 2004). Em situações normais, a FC de um cavalo é compreendida entre 24 e 48 batimentos por minuto (bpm) sendo que a mesma pode ser influenciada pela idade, raça e modalidade desportiva praticada (Nikitin *et al.*, 2022; Triguinho *et al.*, 2023).

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é outro método de avaliação muito fiável nestas situações englobando vários indicadores (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Gehlen, Loschelder, *et al.*, 2020). Desses indicadores temos a média dos intervalos RR que avalia o tempo entre batimentos cardíacos. Uma vez que, com o stress há um aumento dos batimentos cardíacos, o intervalo RR diminui (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020). Os seus valores normais variam bastante sendo que um artigo referiu a possibilidade de que em cavalos em repouso (<60bpm) os valores de RR seriam em média >1000ms, cavalos em transição (60-100bpm) a média estaria entre 600ms e 1000ms, e em cavalos em exercício intenso (>100bpm) o intervalo RR estaria

abaixo dos 600ms, ainda assim, o autor refere a necessidade de mais estudos para compreender e estabelecer os valores de referência (Flethøj *et al.*, 2016).

O desvio padrão dos intervalos NN (SDNN) e a raiz quadrada média das diferenças sucessivas (RMSSD) são dois parâmetros relevantes no que toca à avaliação da VFC (Chrousos *et al.*, 2022). O SDNN representa o desvio padrão de todos os intervalos de normal para normal (NN) refletindo a VFC na sua totalidade sendo influenciada pela atividade simpática e parassimpática (Chrousos *et al.*, 2022; Esco *et al.*, 2018; Munoz *et al.*, 2015; Ortiz-Guzmán *et al.*, 2023; Perek *et al.*, 2023). Os seus valores basais segundo um artigo, num equino em repouso costumam ser de $82,7\text{ms} \pm 20,7$ (Nyerges-Bohák *et al.*, 2025) O RMSSD, reflete nomeadamente as variações de curto prazo e alta frequência na própria FC, sendo um marcador da atividade parassimpática (Chrousos *et al.*, 2022; Esco *et al.*, 2018; Munoz *et al.*, 2015; Ortiz-Guzmán *et al.*, 2023; Perek *et al.*, 2023). Este marcador num equino adulto, segundo Bohák *et al.*, 2018, costuma ter valores entre 38 a 48 ms, podendo haver variações. Já Nyerges-Bohák *et al.*, (2025) fala de 86ms, não havendo ainda valores de referência estabelecidos. Assim, valores abaixo dos descritos acima reduzem a VFC, comprovando que o coração está menos responsivo a mudanças fisiológicas e ambientais, estando então maioritariamente sob influencia do sistema simpático, tendo maior dificuldade de adaptação (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Górecka-Bruzda *et al.*, 2025).

As bandas de baixa frequência (LF) e alta frequência (HF) são medidas bastante utilizadas na avaliação do sistema simpático e no sistema parassimpático (Thomas *et al.*, 2019). O LF reflete maioritariamente atividade simpática, enquanto o HF reflete atividade parassimpática (ACERO *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2019). Assim, quando existe um estímulo de stress existe sempre um aumento do LF (sistema simpático em maioria) e uma diminuição do HF (sistema parassimpático diminuído (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Gehlen, Loschelder, *et al.*, 2020; Rietmann *et al.*, 2004). Num equino adulto, dito saudável, os valores de LF rondam os $707 \pm 649,9\text{ms}$ e o HF ronda os 578.1 ± 491.1 , sendo que, estes valores estão descritos apenas num artigo não havendo ainda um consenso sobre o assunto (Nyerges-Bohák *et al.*, 2025).

O VLF (do inglês "very low frequency") é medido na análise da VFC em conjunto com o LF e HF, sendo que em equinos ainda não é bem compreendido (Szabó *et al.*, 2021; Wonghanchao *et al.*, 2024). Apesar disso, é considerado um parâmetro sensível a estímulos de stress e a estados de recuperação em cavalos, sendo um indicador de mudanças no sistema autónomo (Mendonça *et al.*, 2020; Szabó *et al.*, 2021; Wonghanchao *et al.*, 2024).

Por fim, o rácio LF/HF indica o balanço simpático-vagal, sendo que, quando existe uma ativação exacerbada do sistema simpático (stress) o rácio tem tendência a aumentar (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Gehlen, Loschelder, *et al.*, 2020; Rietmann *et al.*, 2004). Num equino adulto, em repouso, os valores deste marcador encontram-se entre 0,5 e 0,9, sendo que, está ainda descrito que em cavalos com idade superior a 25 anos, este rácio encontra-se diminuído indicando uma dominância do sistema parassimpático (Kuwahara *et al.*, 1999; Santosuosso *et al.*, 2025). Apesar disto, estes valores diferem bastante na literatura não sendo fácil obter intervalos fiáveis.

Estes indicadores cardíacos apenas são fiáveis com equipamentos próprios sendo que, muitos dos dispositivos utilizados atualmente, apresentam baixa precisão e sensibilidade (König *et al.*, 2017; McDuffee *et al.*, 2019). É ainda importante salientar que a idade e experiências anteriores podem afetar estas medições e devem ser considerados (Bartolomé *et al.*, 2013; Górecka-Bruzda *et al.*, 2025).

Além da resposta de stress observa-se frequentemente respostas inflamatórias no cavalo hospitalizado. Assim, coloca-se a hipótese de uma relação da resposta inflamatória com a resposta ao stress (Hassamal, 2023; White *et al.*, 2024).

Nestes casos, quanto exposto a algum EIS, o organismo produz o chamado leucograma de stress, sendo que, cada vez mais a eosinopenia tem sido utilizada na avaliação aguda, tendo uma forte correlação negativa com o cortisol (Shoraba *et al.*, 2024; Stokol, 2020; Villalba-Orero *et al.*, 2024). O aumento do rácio neutrófilos/linfócitos está fortemente associado a uma precariedade no BE e num aumento de stress, em cavalos de alto rendimento, expostos a situações adversas diariamente, como provas, transporte e pessoas desconhecidas, quando comparado com cavalos a campo (Popescu & Diugan, 2017; Snow *et al.*, 1983). É um parâmetro fiável tanto em stress agudo como crónico sendo reconhecido como um marcador fiável na identificação de condições de stress (Popescu & Diugan, 2017; Snow *et al.*, 1983). Relativamente ao eritrograma, episódios de stress e inflamação podem causar flutuações nas contagens de eritrócitos e hemoglobina originando muitas vezes uma descida dos mesmos, sendo que, na fase de adaptação, os níveis devem voltar ao normal (Atata *et al.*, 2025; Borovkov *et al.*, 2024; Stokol, 2020). Apesar do plaquetograma, no diagnóstico de stress em equinos não estar bem descrito, já se fazem algumas correlações em medicina humana (Koudouovoh-Tripp *et al.*, 2021). O aumento da ativação plaquetária e de agregados de plaquetas e leucócitos foi relacionado com o stress mental agudo e crónico (Koudouovoh-Tripp *et al.*, 2021).

A serotonina é armazenada em algumas partes do organismo, entre elas nas plaquetas (Soslau, 2022). Estudos com humanos sugerem a importância dos níveis da serotonina armazenada nas plaquetas devido à sua influência em condições de stress, recomendando-se a medição da concentração deste biomarcador para melhor investigar este tema (Ghosh Anindita Guha, 2023).

Em equinos a avaliação de biomarcadores inflamatórios é já amplamente realizada (Bishop *et al.*, 2024). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que tem sido estudada como marcador de stress e inflamação em cavalos (J. W. Chen *et al.*, 2020). Este marcador demonstra aumentos significativos em processos inflamatórios como habronemose cutânea, síndrome de úlcera gástrica equina e síndrome de abdómen agudo (El-Deeb *et al.*, 2018, 2020; Shawaf *et al.*, 2020). Durante o transporte, esta citocina também demonstra um aumento transitório, podendo estar relacionada com o stress agudo, até porque retorna aos valores normais entre umas horas a um dia após o evento indutor de stress (Arrigo *et al.*, 2024; A. B. Miller *et al.*, 2021). Os valores de referência encontram-se abaixo de 0,017pg/mL (White-Springer, 2021).

Em equinos as MMP-9 encontram-se bastante elevadas nas lavagens broncoalveolares e transtraqueais, sendo um excelente marcador inflamatório do sistema respiratório (Raulo *et al.*, 2001). É também bastante investigado este marcador na doença articular, observando-se um aumento das MMP-9 no líquido sinovial de articulações com sinais de osteoartrite (Fietz *et al.*, 2008). Em medicina humana já estão a correlacionar a concentração de MMP-9 com o diagnóstico de stress pós-traumático (aumento das MMP-9), sendo que após a realização de psicoterapia se observou uma redução destas metaloproteínases no sangue (Chevalier *et al.*, 2021). Os valores de referência (basais) deste biomarcador aproximam-se de 239ng/mL, equivalente a 239000pg/mL (van Spijk *et al.*, 2023). Apesar de haver esta alusão aos valores de referência, muita literatura refere que há demasiada variabilidade das MMP-9, não sendo possível aferir valores de referência.

Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar se a hospitalização tem impacto no stress e, consequentemente, nos processos inflamatórios de um cavalo internado. Secundariamente, pretendeu-se investigar a capacidade de adaptação do cavalo ao contexto de hospitalização.

2. Materiais e Métodos:

Este projeto de investigação foi realizado através da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona tendo sido aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal com o parecer 37/2023.

2.1. População em estudo:

Este estudo clínico e exploratório teve como foco os equinos (*Equus caballus*), com um total de 16 animais, avaliados em ambiente hospitalar, no Hospital Escolar Veterinário de Equinos de Santo Estevão.

2.2. Critérios de inclusão, de não inclusão e de exclusão:

Os critérios de inclusão foram equinos com idades compreendidas entre os 4 e os 20 anos, hospitalizados durante o curso de uma doença, lesão ou procedimentos eletivos, com um internamento de 5 dias. A decisão de inclusão do animal no presente estudo foi feita no momento da admissão hospitalar. Não foram incluídos animais hospitalizados considerados classe 4 (doenças infetocontagiosas), segundo os Protocolos e Procedimentos Padrão de Biossegurança do Hospital Veterinário Escolar de Equinos (HVEE) da FMV-ULusófona, ou cavalos com pouco maneio (equinos destinados à reprodução ou nascidos a campo). Os critérios de exclusão incluíram cavalos que desenvolvessem uma doença infetocontagiosa ou uma alteração clínica associada a dor intensa ou inflamação aguda durante o estudo (após a fase de inclusão). Os procedimentos invasivos realizados em alguns dos cavalos (cirurgia), na maioria, foram realizados no terceiro dia de internamento.

2.3. Metodologia:

Neste projeto foram recolhidos dados fisiológicos e comportamentais durante 5 dias de hospitalização do equino. Para melhor perceção da recolha destes dados foi utilizado um cronograma que demonstra os dados diariamente registados sendo que T0 corresponde ao dia de admissão e T4 corresponde aos últimos dados recolhidos antes da alta do animal (Figura 1).

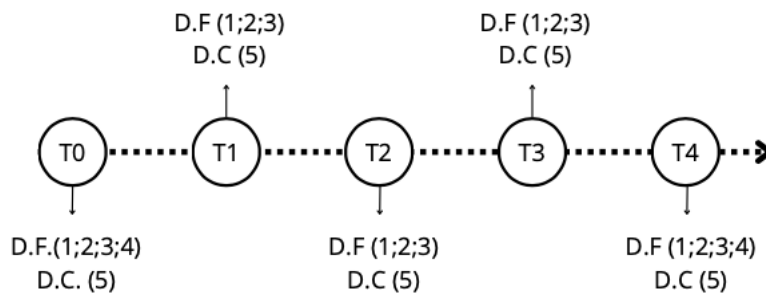


Figura 1: Cronograma de recolha de dados fisiológicos e dados comportamentais. (D.F. – Dados Fisiológicos; D.C. – Dados comportamentais; T0 – admissão do equino; T1 – 2º dia de recolha de dados; T2 – 3º dia de recolha de dados; T3 – 4º dia de recolha de dados; T4

Em T0, momento correspondente à admissão do cavalo, o mesmo foi sujeito a um exame de estado geral (EEG) tendo sido avaliado a atitude, o peso, a FC e a VFC, a frequência respiratória (FR), a motilidade abdominal, o estado das mucosas, o tempo de repleção capilar (TRC) e o pulso digital.

Foram recolhidas amostras de sangue, saliva e fezes para posterior análise laboratorial.

Em T1, T2 e T3 o equino foi submetido aos mesmos procedimentos, com exceção da recolha de sangue, saliva e fezes.

No dia da alta clínica, correspondente ao T4, foram realizados todos os procedimentos do momento da admissão (T0).

2.3.1. Amostras de sangue, saliva:

A recolha de sangue foi realizada na veia jugular com uma seringa de 20 ml acoplada a uma agulha de 20G. O sangue foi transferido para um tubo de EDTA de 10 ml, para um tubo de EDTA de 3ml e para um tubo seco de 10 ml. A saliva foi recolhida numa esponja (Salivette®, Sarstedt, Alemanha), com o auxílio de uma pinça hemostática. A esponja foi posicionada na cavidade oral do equino através da barra, correspondente ao espaço entre os caninos e os pré-molares. A esponja foi mantida em posição durante um minuto. No total foram recolhidas 2 esponjas por cavalo.

Todas estas amostras foram enviadas para o laboratório (FMV-ULusófona), com intervalo máximo de 24 horas entre a colheita e a entrega. O tubo de EDTA de 3 ml foi imediatamente processado para análise do hemograma. As restantes amostras (ambos os tubos de 10 ml e as 2 esponjas) foram congelados a -80°C para posterior análise de biomarcadores: MMP-9, IL-6, cortisol e serotonina.

2.3.2. Variabilidade da frequência cardíaca:

A monitorização da frequência cardíaca e da VFC foram efetuadas, diariamente durante 45 minutos, através de um monitor da variabilidade da frequência cardíaca (Equimetre®). Este aparelho, validado cientificamente para o diagnóstico de patologia cardíaca (ter Woort *et al.*, 2023), consiste numa cinta com dois elétrodos: um colocado junto ao garrote do lado esquerdo e outro colocado perto do codilho, também no lado esquerdo (Figura 2). Este dispositivo incorpora um sistema de identificação por microchip, permitindo a identificação do animal, bem como o armazenamento dos dados obtidos na plataforma do sistema. Salientar que, estas medições (colocação do aparelho) foram efetuadas por vários operadores, podendo ter influenciado a análise. Todos os animais receberam um código, sendo este o código associado ao microchip no equipamento de monitorização cardíaca, garantindo assim o anonimato dos animais envolvido.

Posteriormente, os dados foram transferidos para o software Kubios®, uma ferramenta de avaliação do ritmo cardíaco, para analisar a variabilidade da frequência cardíaca.



Figura 2 : Colocação do aparelho Equimetre®. 1- Lado direito do cavalo; 2- lado esquerdo do cavalo; A- posição do leitor de microchips e armazenador de dados; B- eletrodos

2.3.3. Análise de Biomarcadores:

2.3.3.1. Metaloproteinase de matriz-9

A medição da concentração das metaloproteinases foi realizada em amostras de saliva e de plasma através do Equine MMP-9 ELISA Kit® com número de referência EE5RB estando o protocolo utilizado descrito e validado cientificamente (Baburathinam *et al.*, 2019; A.-K. Barton *et al.*, 2021; Geng *et al.*, 2023; McNicholas *et al.*, 2022; Pazhani *et al.*, 2023; Yun *et al.*, 2022).

2.3.3.2. Cortisol

A medição da concentração do cortisol foi realizada em amostras de saliva e plasma através do Cortisol ELISA Kit, com número de referência KA3382 estando o protocolo utilizado descrito e validado cientificamente (Djordjevic *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2025; Jaedicke *et al.*, 2012; Lewis & Elder, 1985; Share *et al.*, 2024; Smeets *et al.*, 2021; Thomsson *et al.*, 2014).

2.3.3.3. Interleucina 6

A medição da concentração da interleucina 6 foi realizada em amostras de saliva e plasma através do ELISA Kit (Thermofisher®, USA), estando o protocolo utilizado descrito e validado cientificamente (Helle *et al.*, 1991).

2.3.3.4. Serotonina

A medição da concentração da serotonina foi realizada em amostras de saliva e plasma através do kit Serotonin ELISA Kit (Abnova, Taiwan), com número de referência KA2518, estando o protocolo utilizado descrito e validado cientificamente (Chabaud *et al.*, 2018; Jeong *et al.*, 2023; S. Kim *et al.*, 2025).

2.3.4. Análise estatística

A normalidade das variáveis foi testada através do teste de Shapiro-Wilk. Tendo sido verificada a normalidade, realizaram-se análises com recurso ao teste t para amostras emparelhadas, permitindo assim avaliar diferenças sistemáticas entre as medições do dia 1 e do dia 5. Foi ainda realizada uma correlação de Pearson com objetivo verificar se as concentrações de biomarcadores na saliva se correlacionam, positiva ou negativamente, com as concentrações plasmáticas (validação de métodos não invasivos).

Por fim, a evolução dos parâmetros cardíacos, ao longo dos cinco dias, foi analisada descritivamente, através de gráficos de perfil de médias, para retratar a dinâmica e a tendência geral de cada variável ao longo do período observado.

Resultados

Neste estudo foram incluídos 16 animais sendo que, devido a problemas de processamento de amostra não foi possível obter resultados em todos os parâmetros para todos os animais. Foi possível obter resultados num total de 11 animais para os parâmetros hematológicos; e na totalidade dos animais (n=16) para os biomarcadores.

Quanto aos parâmetros cardíacos foi possível analisar a FC nos 16 animais e a variabilidade da frequência cardíaca em 9 animais. Os dados em falta tem a ver com artefactos produzidos durante a colheita de dados com o equipamento Equimeter®.

3.1. Resultados do hemograma:

No que toca aos leucócitos, neutrófilos e linfócitos, (Gráfico 5) podemos observar que, entre o dia 1 e o dia 5, os leucócitos e os neutrófilos obtiveram uma descida significativa (leucócitos: $df=10$; $t=2,32$; $p<0,05$; neutrófilos: $df=10$; $t=2,74$; $p<0,05$), enquanto os linfócitos não apresentaram diferença significativa (linfócitos: $df=10$; $t=1,30$; $p=0,22$).

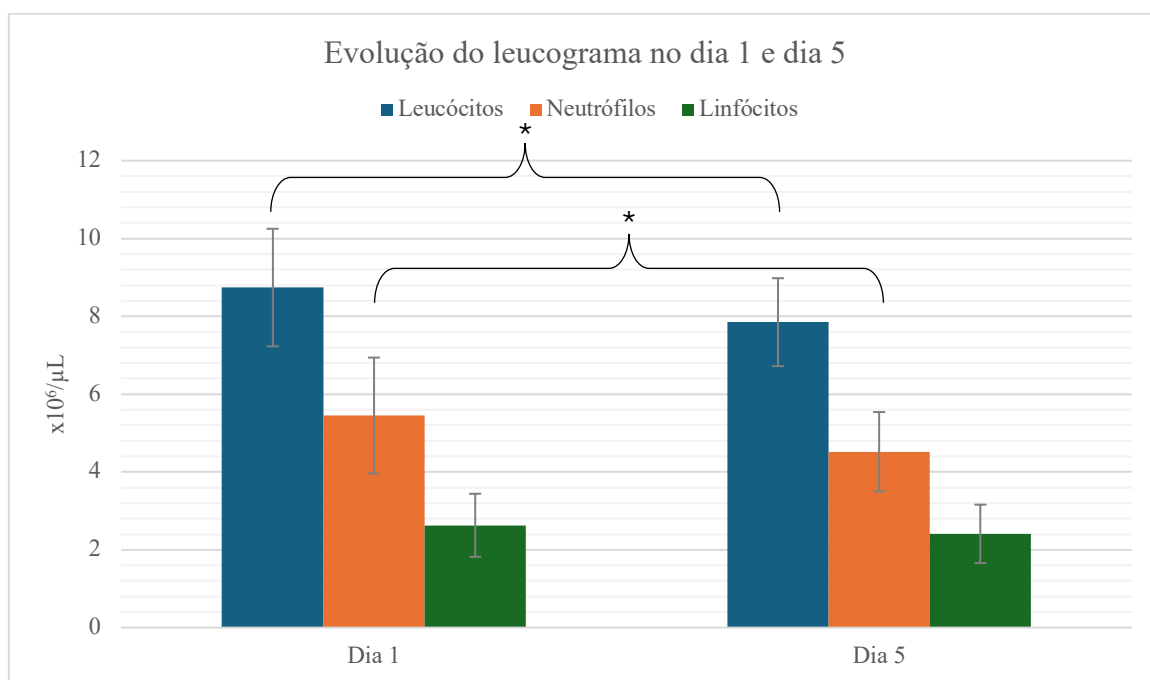


Gráfico 5 Evolução dos Leucócitos, Neutrófilos e Linfócitos entre o dia 1 e dia 5

Relativamente às plaquetas (PLT), ao VPM, e ao PCT, não se observaram diferenças significativas (plaquetas: $df=10$; $t=0,52$; $p=0,62$; VPM: $df=10$; $t=-0,72$; $p=0,49$; PCT: $df=10$; $t=-0,51$; $p=0,62$).

No que diz respeito aos rácios, observaram-se diferenças significativas no rácio neutrófilos-plaquetas (N/P; $df=10$; $t=2,88$; $p<0,05$; Gráfico 6) , no rácio leucócitos-VPM(L/VPM; $df=10$; $t=2,43$; $p<0,05$; Gráfico 7), e no rácio neutrófilos-VPM (N/VPM; $df=10$; $t=2,82$; $p<0,05$; Gráfico 7)

Quanto ao rácio neutrófilos/linfócitos (N/Li), ao rácio leucócitos/plaquetas (L/P), ao rácio plaquetas/linfócitos, e ao rácio linfócitos/VPM (Li/VPM), não se observaram diferenças significativas entre o dia 1 e o dia 5 (N/L: $df=10$; $t=1,42$; $p=0,19$; L/P: $df=10$; $t=1,32$; $p=0,22$; P/L: $df=10$; $t=-0,25$; $p=0,81$; L/VPM: $df=10$; $t=1,90$; $p=0,09$).

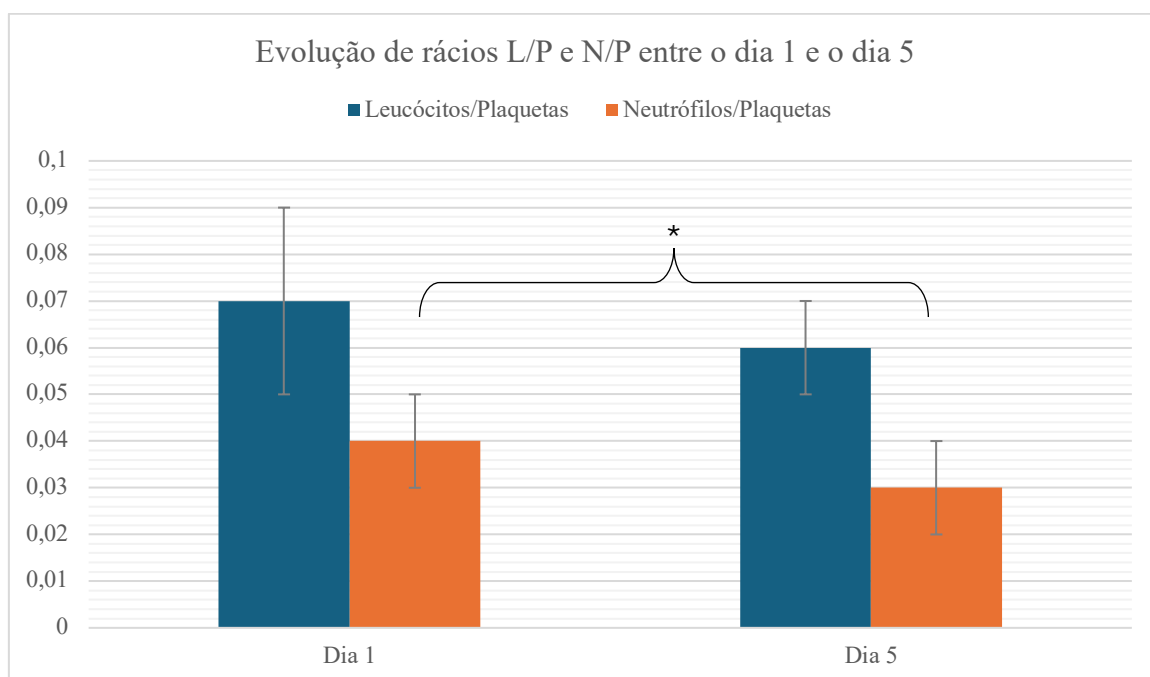


Gráfico 6: Evolução dos rácios Leucócitos/Plaquetas e Neutrófilos/Plaquetas entre o dia 1 e o dia 5. L/P: leucócitos/plaquetas; N/P: neutrófilos/plaquetas

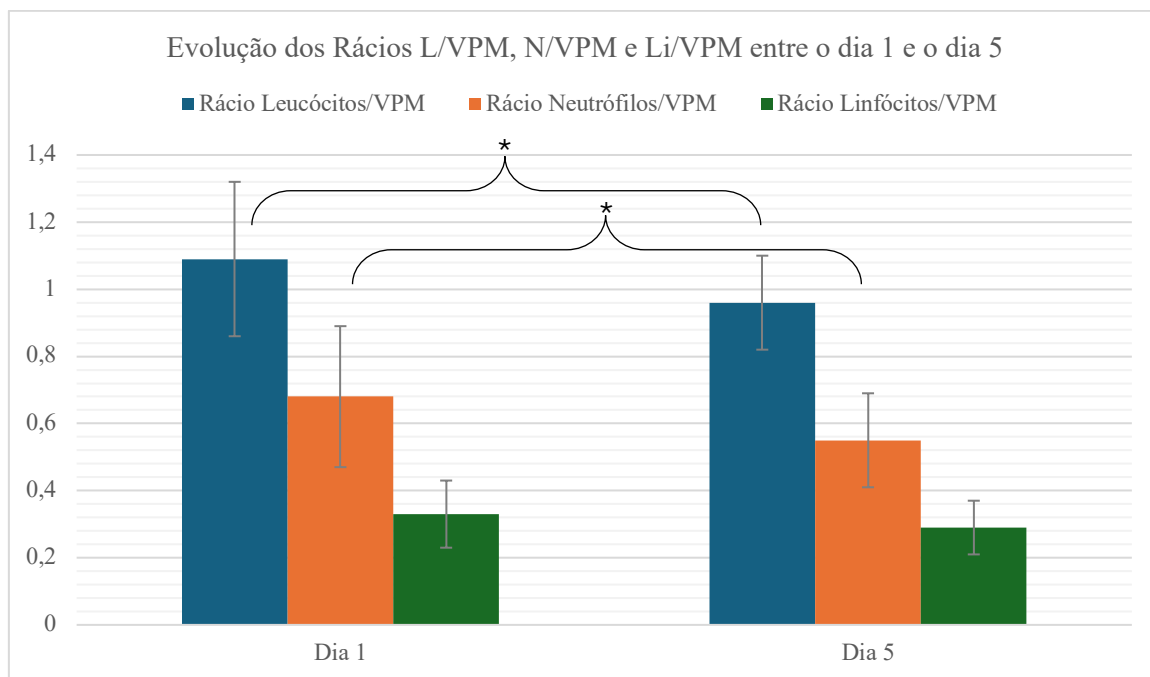


Gráfico 7: Evolução dos Rácios Leucócitos/VPM, Neutrófilos/VPM e Linfócitos/VPM entre o dia 1 e o dia 5. L/VPM: leucócitos/volume plaquetário médio; N/VPM: neutrófilos/volume plaquetário médio; L/VPM: linfócitos/volume plaquetário médio

3.2. Correlações e evolução dos biomarcadores sanguíneos e salivares:

Observou-se uma correlação positiva entre o cortisol plasmático e salivar no dia 5 ($r=0,848$; $p<0,001$; Gráfico 8). Não foram observadas correlações entre o cortisol plasmático e salivar no dia 1 ($r=0,367$; $p=0,162$).

Observou-se uma tendência estatística para a uma correlação positiva da IL6 plasmática e salivar do dia 1 ($r=0,477$; $p=0,062$; Gráfico 9). Não foram observadas correlações entre a IL6 plasmática e salivar no dia 5 ($r=0,433$; $p=0,107$).

Não foram observadas correlações na serotonina plasmática/salivar, nem na MMP9 plasmática/salivar em nenhum dos dias (serotonina dia 1: $r=-0,005$; $p=0,986$; serotonina dia 5: $r=0,269$; $p=0,314$; MMP-9 dia 1: $r=0,191$; $p=0,478$; MMP-9 dia 5: $r=-0,177$; $p=0,511$).

Não foram observadas diferenças significativas nos biomarcadores estudados entre o dia 1 e o dia 5 (serotonina plasma: $df=15$; $t=1,323$; $p=0,206$; serotonina saliva: $df=15$; $t=1,314$; $p=0,209$; cortisol plasma: $df=15$; $t=-1,474$; $p=0,161$; cortisol saliva $df=15$; $t=-0,361$; $p=0,723$; MMP-9 plasma: $df=15$; $t=1,162$; $p=0,264$; MMP-9 saliva: $df=15$; $t=1,735$; $p=0,103$; IL-6 plasma: $df=15$; $t=-0,330$; $p=0,746$; IL-6 saliva: $df=15$; $t=0,201$; $p=0,844$).

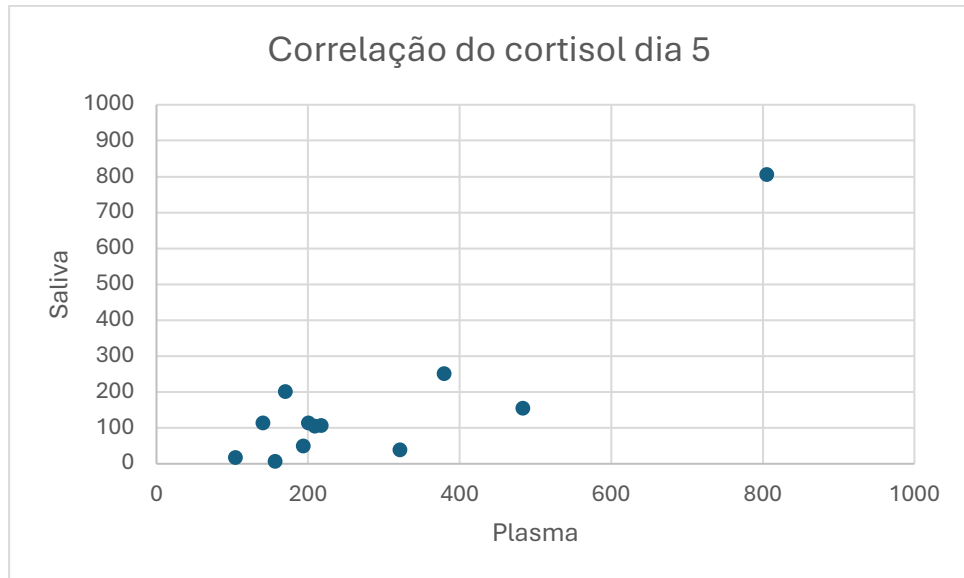


Gráfico 8: Correlação do cortisol no dia 5

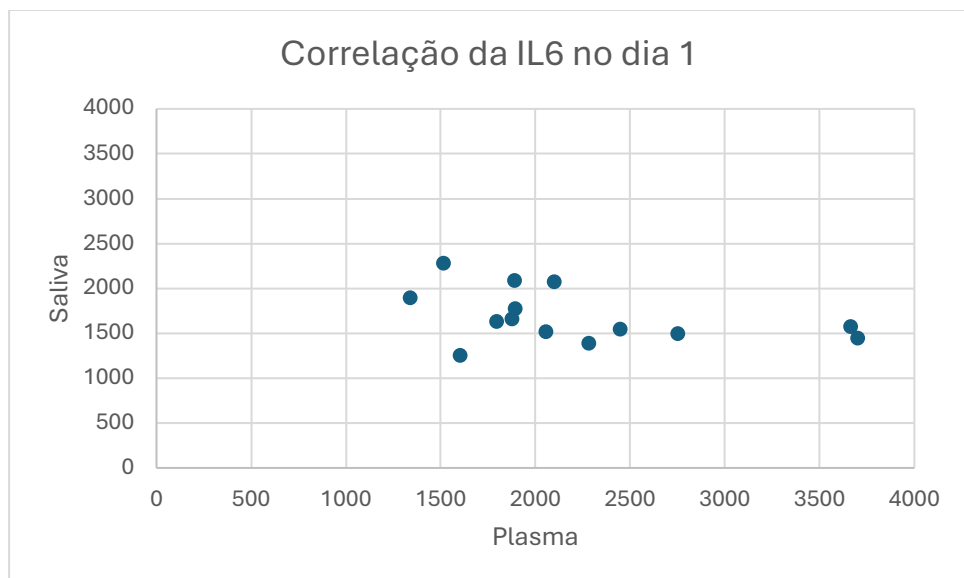


Gráfico 9: Correlação da IL6 no dia 1

3.3. Resultados dos dados cardíacos:

Os dados cardíacos abaixo retratados foram expostos a uma análise descritiva geral ao longo dos 5 dias, sendo que ainda foi observado a sua variabilidade entre os dias 1 e 5.

Relativamente à FC (Gráfico 10), houve um pico no segundo dia (39bpm), descendo no terceiro dia para os 37,5bpm, mantendo-se relativamente estável até ao 5º dia.

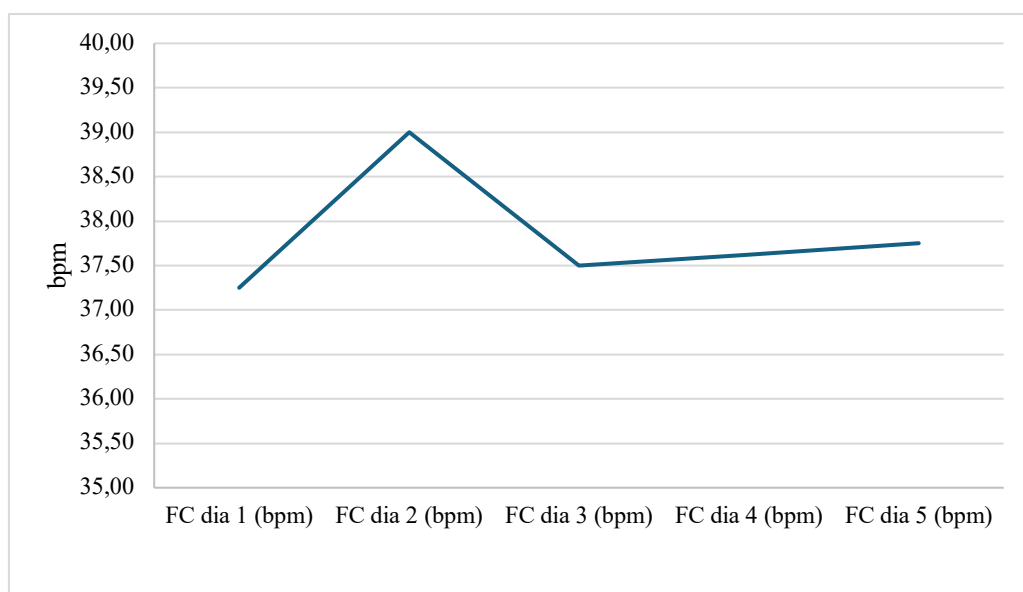


Gráfico 10: Avaliação da frequência cardíaca ao longo dos 5 dias

No que toca aos parâmetros de avaliação da VFC, na média RR, (Gráfico 11) observou-se estabilidade do dia 1 para o dia 2, uma ligeira subida do dia 2 para o dia 3, uma descida abrupta do dia 3 para o dia 4 e uma subida do dia 4 para o dia 5. Do dia 1 para o dia 5 houve uma descida de $1128,78 \pm 360,4\text{ms}$ para $1066,67\text{ms} \pm 357,3$.

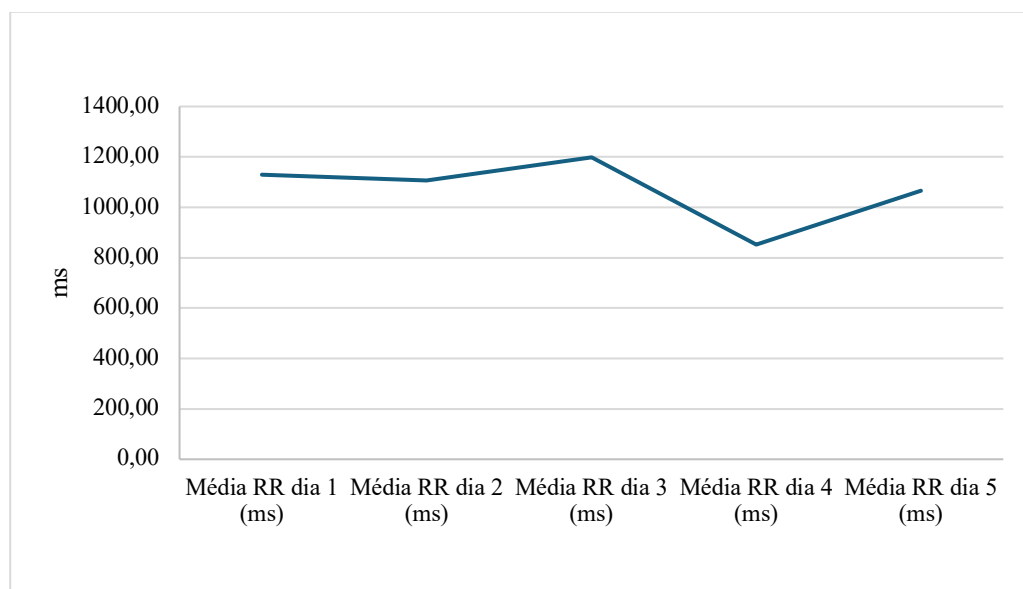


Gráfico 11: Avaliação da Média RR ao longo dos 5 dias

Na análise do SDNN (Gráfico 12) foi possível averiguar que do dia 1 para o dia 2 ocorreu um aumento, mantendo-se estável até ao dia 4, onde ocorreu novamente um aumento

até ao dia 5. Tendo no fim ocorrido um aumento do dia 1 ($200,41\text{ms} \pm 120,5$) para o dia 5 ($255,69\text{ms} \pm 140,3$).

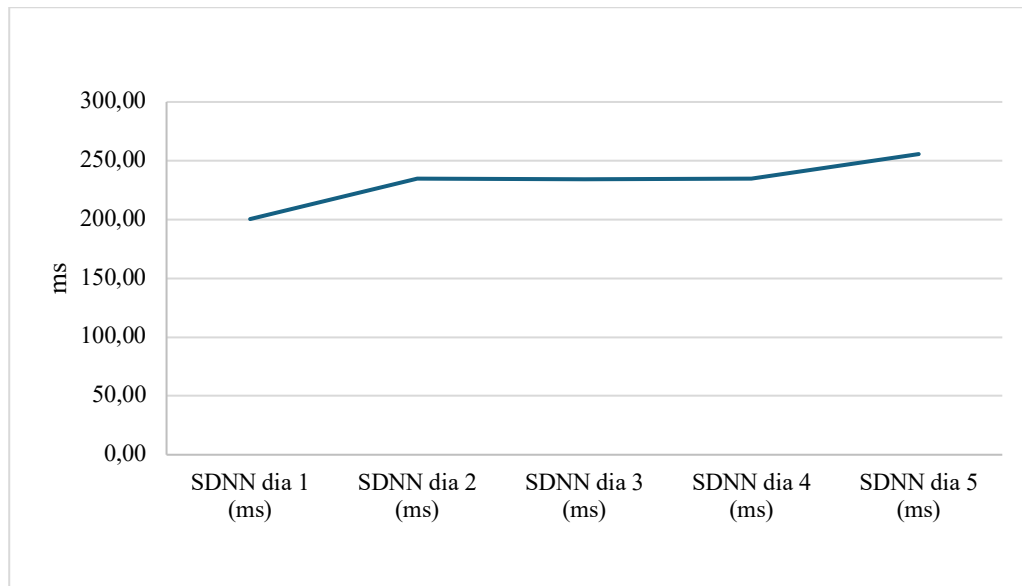


Gráfico 12: Avaliação do SDNN ao longo dos 5 dias

O RMSSD (Gráfico 13) teve um aumento entre o dia 1 e o dia 2 e entre o dia 3 e dia 4, observando-se um decréscimo do dia 2 para o dia 3 e do dia 4 para o dia 5. Por fim, observou-se um aumento entre o dia 1 ($274,91 \pm 199,8\text{ms}$) e o dia 5 ($338,74\text{ms} \pm 222,8$).

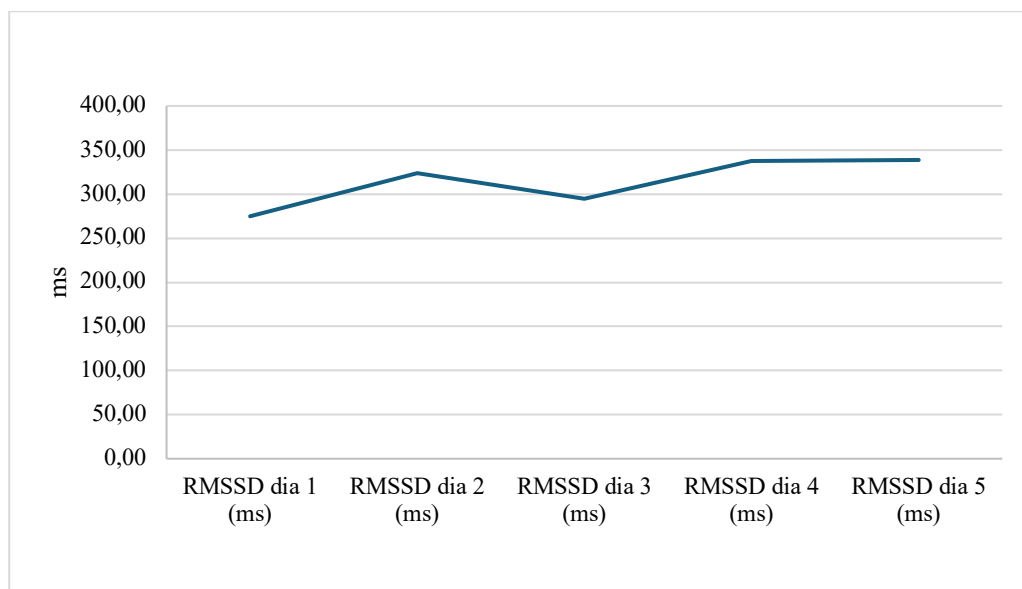


Gráfico 13: Avaliação do RMSSD ao longo dos 5 dias

No que diz respeito ao LF (Gráfico 14) e ao HF (Gráfico 15) foi possível constatar que o seu desenvolvimento ao longo dos cinco dias foi semelhante. Observou-se uma subida do dia 1 para o dia 2 e do dia 4 para o dia 5, enquanto se observou uma descida do dia 2 para o dia 3 e do dia 3 para o dia 4. Comparando apenas o dia 1 com o dia 5, observou-se uma diferença

significativa do LF entre o dia 1 e o dia 5 ($df=8$; $t=-2,733$; $p<0,05$) e uma tendência estatística no HF ($df=8$; $t: 2,242$; $p=0,055$).

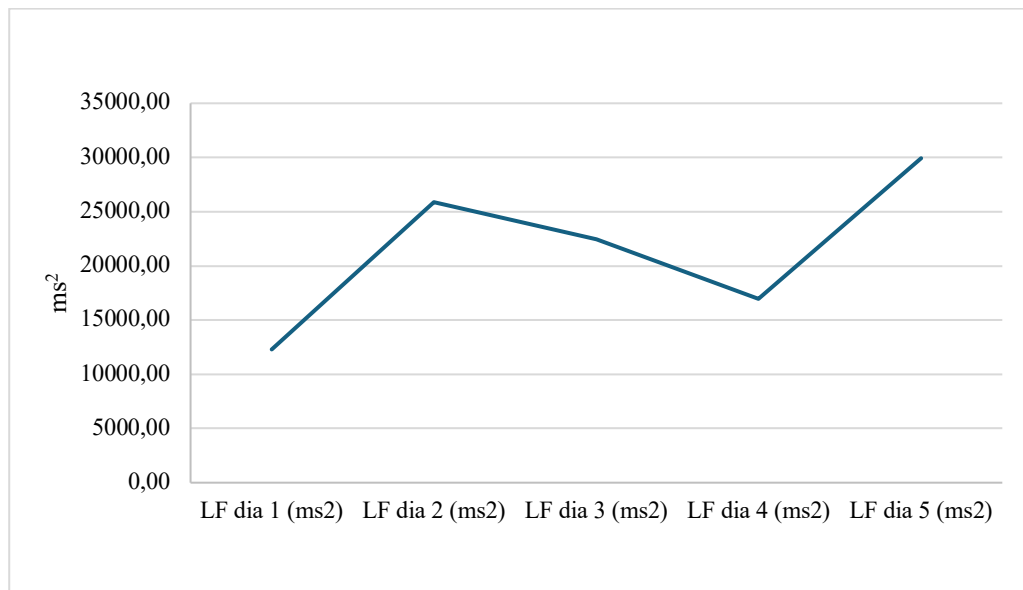


Gráfico 14: Avaliação do LF ao longo dos 5 dias

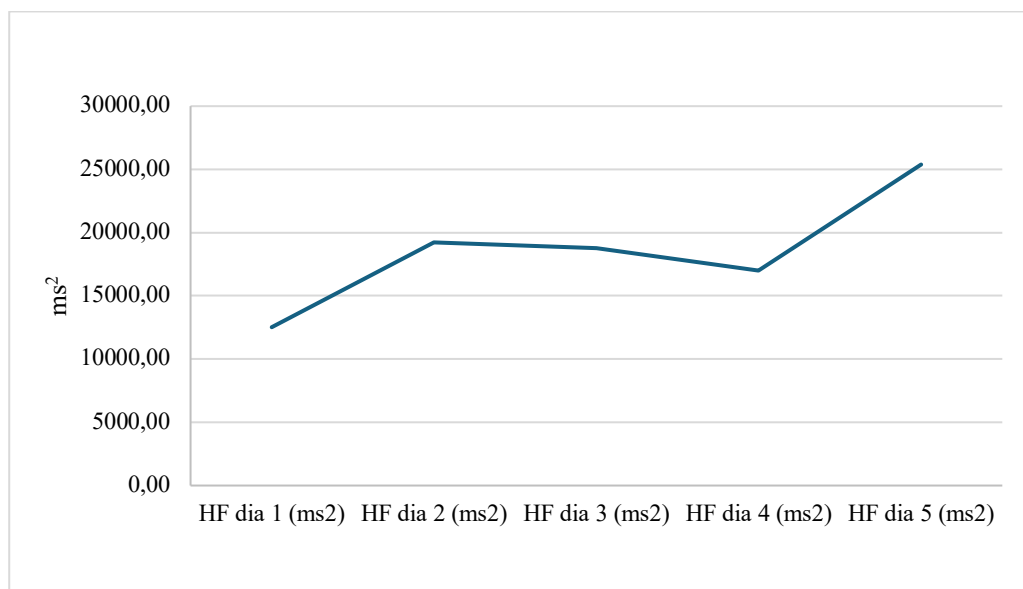


Gráfico 15: Avaliação do HF ao longo dos 5 dias

Observando o perfil de médias do VLF (Gráfico 16) foi possível constatar um aumento considerável do dia 1 para o dia 3, e de seguida, uma diminuição até ao último dia. Observou-se uma diferença significativa entre o dia 1 e o dia 5 ($df: 8$; $t: 2,531$; $p<0,05$).

No que toca ao rácio LF/HF, (Gráfico 17) observou-se um aumento do dia 1 para o dia 2, com uma descida idêntica do dia 2 para o dia 3, tendo-se mantido estável, perto de 1,5, até ao dia 5.

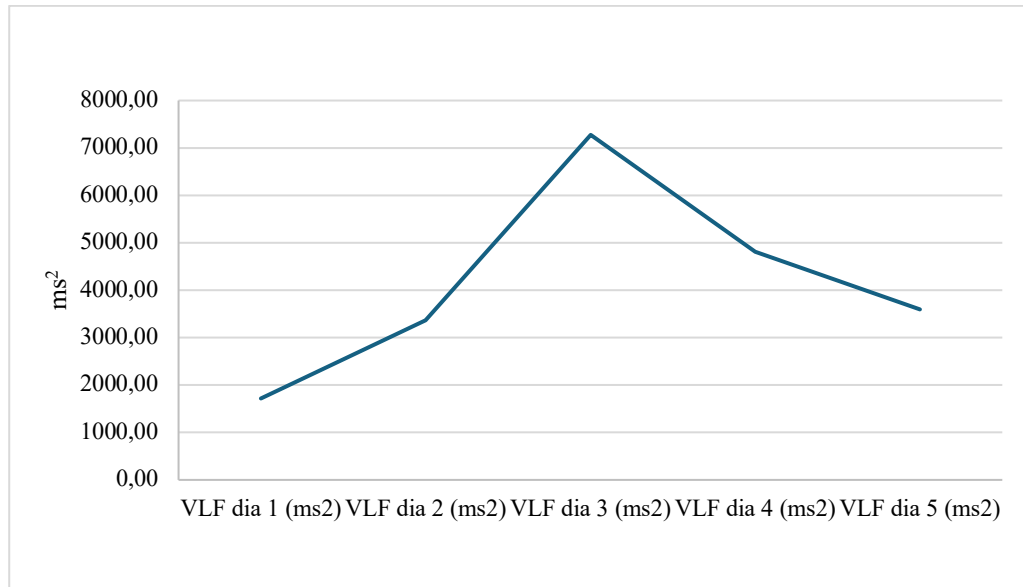


Gráfico 16: Avaliação do VLF ao longo dos 5 dias

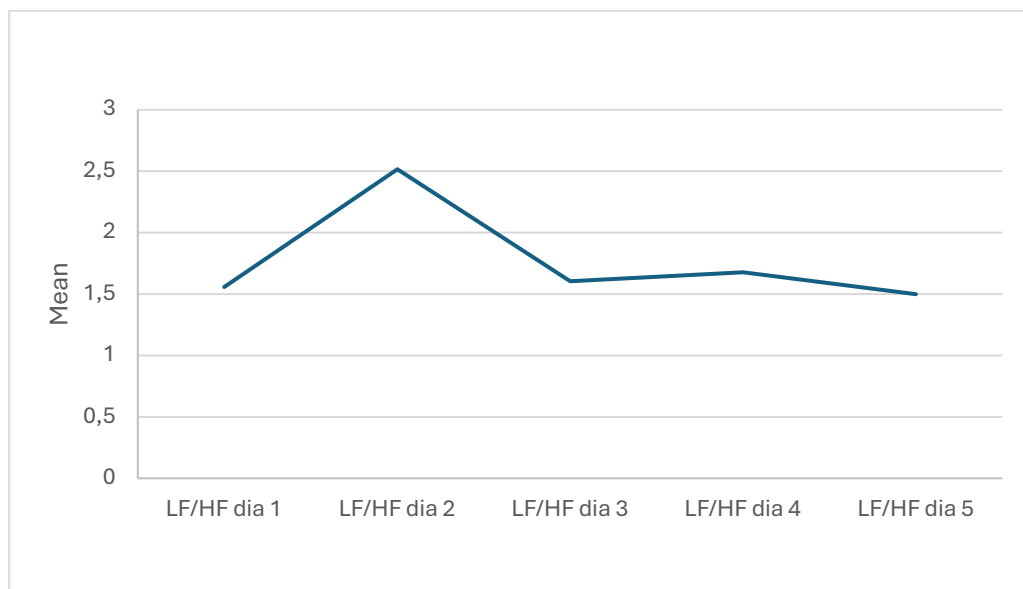


Gráfico 17: Avaliação do Rácio LF/HF ao longo dos 5 dias

3.4. Correlações de parâmetros diversos:

Observou-se uma correlação positiva entre as MMP9 plasmáticas e o LF ($r=0,72$ $p<0,05$; Gráfico 18) no dia 1. Foi possível observar também uma correlação positiva entre os Leucócitos e os Neutrófilos ($r=0,65$; $p<0,05$; Gráfico 19) no dia 1.

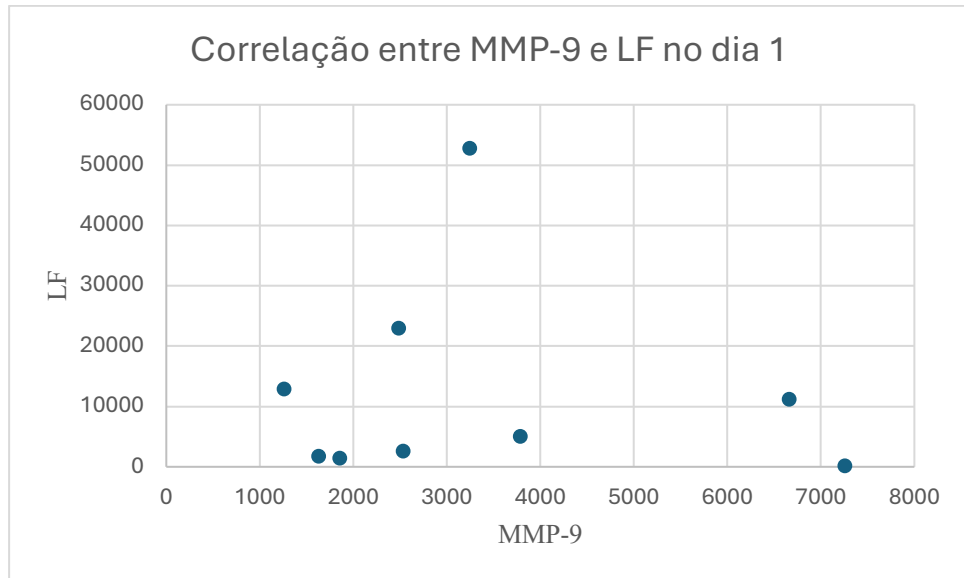


Gráfico 18: Correlação entre MMP-9 e LF no dia 1

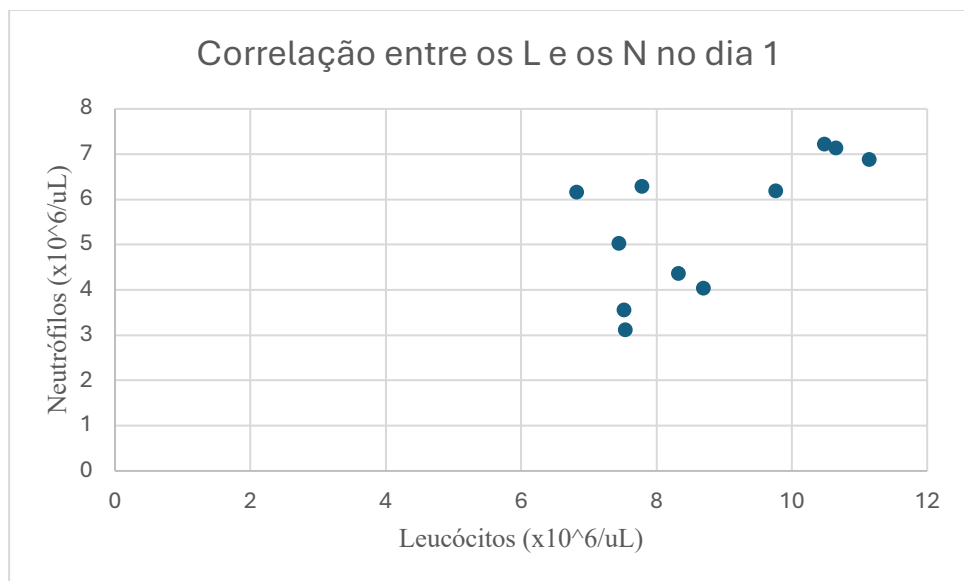


Gráfico 19: Correlação entre os leucócitos e neutrófilos no dia 1

Discussão:

O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da hospitalização dos equinos no stress e na inflamação, bem como a eficácia de determinados biomarcadores no diagnóstico destas condições e a sua correlação entre a saliva e o sangue.

No que toca à resposta inflamatória observou-se uma diminuição significativa dos leucócitos e dos neutrófilos entre a admissão (dia 1) e a alta clínica (dia 5; Gráfico 5). Esta diminuição pode sugerir uma resposta inicial ao stress, seguida de um processo adaptativo ao ambiente hospitalar. A leucocitose transitória nos equinos relacionada com o stress corresponde, normalmente, a uma neutrofilia acompanhada de linfopenia, podendo ser observado pelo aumento do rácio neutrófilos/linfócitos muitas vezes avaliado (Arfuso *et al.*, 2023; Cywińska *et al.*, 2010; Schmucker *et al.*, 2022). Neste estudo não se observaram diferenças significativas nos linfócitos podendo ser devido ao reduzido número de amostras e/ou um desvio padrão elevado, não sendo esta a resposta comum ao stress.

Nas plaquetas registou-se uma diminuição, contudo não significativa. Apesar de os equinos terem sido submetidos a procedimentos eletivos, muitos deles envolvem incisões cirúrgicas. Neste contexto, as plaquetas desempenham um papel crucial na hemostasia e na regeneração dos tecidos danificados (Cortese *et al.*, 2020). Como nem todos os equídeos foram submetidos a procedimentos invasivos, é possível que tenha ocorrido um aumento do desvio padrão, contribuindo para a insignificância estatística.

Relativamente ao VPM, foi possível confirmar um aumento na média do mesmo, apesar de estatisticamente não haver diferenças significativas entre o dia 1 e o dia 5. Este parâmetro pode estar aumentado associado a um incremento na produção de plaquetas imaturas, a uma perda de sangue por hemorragia ou a uma migração para tecidos afetados (Lippi *et al.*, 2021). Neste caso, o aumento neste parâmetro ainda que ligeiro pode ter sido originado através do seu consumo em processos inflamatórios levando a uma ligeira produção por feedback negativo. Em medicina humana o VPM tem vindo a ser associado com quadros clínicos de ansiedade e depressão (Fábián *et al.*, 2022). Assim, apesar do aumento deste marcador não apresentar significância estatística, em alguns dos cavalos pode ter havido ligeiras inflamações. Contudo, a inflamação causada pelos procedimentos, podendo ser considerada ligeira, não originou um aumento significativo deste parâmetro.

Não há muita evidência científica quando ao uso do plaquetócrito na análise de inflamação ou mesmo do stress. Neste caso, podemos constatar um ligeiro aumento não significativo deste parâmetro no 5º dia. Este aumento, apenas permite constatar que no dia 5

havia mais massa plaquetária no sangue do que no dia 1, sendo necessários mais estudos para compreender o seu significado biológico em cavalos.

No caso deste estudo, e apesar de não haver resultados estatísticos relevantes no rácio neutrófilos/linfócitos, foi possível observar um decréscimo na sua média. Esta diminuição pode estar associada a um processo adaptativo do animal para reduzir o stress ou à redução/desaparecimento do estímulo indutor de stress. Neste estudo, o stress inicial poderá ter sido causado pelo transporte ou pelo período de adaptação a um novo ambiente que, naturalmente, foi diminuindo ao longo dos dias. Estes resultados são comparáveis com os de outros autores que explicaram a relação do aumento do rácio com a precariedade no BE e ao aumento de stress (Popescu & Diugan, 2017; Snow *et al.*, 1983).

No que toca ao rácio neutrófilos/plaquetas (Gráfico 6), foi observado um decréscimo significativo entre o dia 1 e o dia 5. Normalmente, numa resposta inflamatória aguda, ambos os parâmetros estão aumentados ou em caso de uma inflamação grave (sepsis) ambos podem estar diminuídos por consumo e pela formação de complexos inflamatórios e de coagulação (S. Chen *et al.*, 2025; Lisman, 2018; Liu *et al.*, 2025; Mandel *et al.*, 2022). Neste caso, o que se observou foi uma diminuição significativa dos neutrófilos e um ligeiro aumento (não significativo) das plaquetas. Se o decréscimo observado nos neutrófilos fosse de origem inflamatória, por sequestro, as plaquetas deveriam, segundo a literatura referida em cima, estar diminuídas, o que nos leva a crer que essa diminuição poderá ser devido à adaptação ao stress.

No caso da avaliação do rácio leucócitos/plaquetas, não se observaram diferenças significativas, o que nos leva a crer que em avaliações de rácios não nos devemos cingir apenas aos leucócitos uma vez que são uma família celular representativa de um vasto número de células inflamatórias com diferentes comportamentos, por vezes, contraditórios (Calder *et al.*, 2013; Ruparelia *et al.*, 2017).

O rácio plaquetas/linfócitos não sofreu alterações significativas entre o dia de admissão e o dia de alta clínica. Este rácio é muito usado como um marcador inflamatório (Gasparyan *et al.*, 2019), o que nos leva a crer que durante este período, os cavalos não manifestaram um processo inflamatório suficientemente instalado para fazer alterar este rácio.

Observou-se uma descida significativa no rácio leucócitos/VPM e neutrófilos/VPM (Gráfico 7). Neste caso esta descida deveu-se à diminuição significativa tanto dos leucócitos como dos neutrófilos e não a alterações por parte do VPM. Este marcador poderá ser interessante no caso da avaliação de stress crónico, uma vez que havendo uma possível ligação

entre o VPM e a ansiedade ou mesmo a depressão poderá haver uma diminuição considerável deste parâmetro em animais afetados por estas patologias (Fábián *et al.*, 2022).

Relativamente à serotonina observou-se um aumento quase impercetível, sem valor estatístico, no plasma, bem como uma redução não significativa na saliva. Os resultados obtidos no estudo da serotonina plasmática indicam que os níveis de serotonina no sangue permaneceram relativamente inalterados. Apesar da existência de estudos onde a deteção de serotonina na saliva em humanos não foi registada por estar abaixo dos níveis de deteção, neste estudo observaram-se concentrações salivares em cavalos. Contudo, é importante salientar que existe uma variabilidade considerável entre os animais, o que compromete a fiabilidade do método, apesar da sua natureza não invasiva (Hall *et al.*, 2021; Jasim *et al.*, 2020).

A variação observada no cortisol, apesar de não significativa, foi no sentido de um aumento deste parâmetro entre o dia 1 e o dia 5. Normalmente, o cortisol atinge o seu pico por volta dos 20-30min após o estímulo de stress havendo um decréscimo ao longo do período de recuperação, normalmente entre 30 e 60 minutos (Dickerson & Kemeny, 2004; Ditzen *et al.*, 2019; R. Miller *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2001). O valor de cortisol basal num equino adulto, vai desde os 12ng/mL até 158,3ng/mL (James *et al.*, 1970; Sikorska *et al.*, 2023). Neste caso, sendo a média dos valores iniciais no plasma, de 393,48ng/mL podemos concluir que no dia 1, os cavalos já apresentavam um aumento considerável deste parâmetro indicando então uma resposta de stress. O aumento deste biomarcador no dia 5 pode ter sido devido ao facto de muitos destes animais terem sido sujeitos a procedimentos cirúrgicos e anestésicos que, como descrito anteriormente, podem potenciar o aumento de cortisol (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Taylor, 1989). Sendo que alguns dos animais incluídos não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, o desvio padrão da amostra foi elevado, podendo ter influenciado os resultados, tanto da comparação do dia 1 com o dia 5, como a correlação entre o cortisol sanguíneo e salivar.

No que diz respeito às MMP-9 não foram observadas alterações significativas entre o primeiro e o último dia, sendo que, o valor médio no plasma verificado no dia 1 (2928,31pg/mL $\pm$ 1766,45) encontrava-se abaixo da concentração basal de um cavalo saudável (239ng/mL, equivalente a 239000pg/mL; van Spijk *et al.*, 2023). Não se encontrou nenhuma referência na literatura que apresentasse uma concentração tão baixa de MMP-9. Assim, colocou-se a hipótese de ter havido alguma influência do processamento das amostras nestes resultados pela inexperiência do autor. Como dito anteriormente, existe muita literatura que afirma a dificuldade de quantificar os valores de referência deste parâmetro, podendo então o valor

referido em cima não ser fiável. Apesar disso, a literatura descreve que, num cavalo dito saudável, as concentrações de MMP-9 não variam diariamente (van Spijk *et al.*, 2023). Assim apenas podemos afirmar que este parâmetro não sofreu alterações entre os dias, podendo não ser um marcador fiável para estes contextos. Não foi verificada nenhuma correlação entre a saliva e o sangue, sendo que para este biomarcador, a saliva poderá não ser um meio de colheita fiável, ou requerer outra metodologia analítica, ainda por estudar, para que se torne um marcador válido.

Relativamente à IL-6, não foram observadas diferenças significativas. Contudo, o valor médio observado no sangue, tanto no dia 1 (2664,29pg/mL $\pm$ 1459,71), como no dia 5 (2814,21pg/mL $\pm$ 1308,64) é bastante elevado considerando os valores basais encontrados na literatura, normalmente abaixo de 0,017pg/mL (White-Springer, 2021). Neste caso, pode ter havido algum problema ou com o processamento das amostras, ou com os kits ELISA, uma vez que estes valores na literatura estão relacionados com cólicas severas e endotoxémia, não sendo o caso dos animais em estudo (M. H. Barton & Collatos, 1999). Apesar de ainda não terem sido estabelecidos valores basais desde marcador na saliva, a análise estatística observada mostrou uma tendência para uma correlação da concentração plasmática com a salivar, sendo importante continuar a investigar este marcador (White-Springer, 2021).

A análise da média FC (Gráfico 10) permitiu observar um pico no dia 2 (39bpm), não sendo clinicamente relevante, uma vez que não ultrapassou o intervalo considerado normal de bpm (24 e 48bpm; Nikitin *et al.*, 2022; Triguinho *et al.*, 2023). Este parâmetro é bastante influenciável pelo operador, uma vez que, se este não permitir que o cavalo se familiarize com a sua presença, este pode mostrar sinais de desconforto, aumentando a FC nos primeiros minutos, tornando pouco fiável na avaliação do stress (Bartolomé *et al.*, 2013; Rietmann *et al.*, 2004).

Uma vez que a FC por si só não demonstra significado no diagnóstico de stress, procedemos à análise de vários parâmetros relacionados com a VFC (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020). Um dos parâmetros avaliados foi a média dos intervalos RR (Gráfico 11). No cavalo está descrito, em repouso, uma variação de entre 1,360 e 2,140 ms (Flethøj *et al.*, 2016; Klinik für Pferdemedizin & vet Colin Schwarzwald., 2017.; Meijler *et al.*, 1984). No momento de exercício ou de stress, ocorre um aumento da FC resultando numa diminuição do intervalo RR (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020). Apesar de não haver diferenças estatísticas, no dia 4, houve uma diminuição abaixo do valor basal, que, apesar das flutuações ocorrentes ao longo dos dias, o

dia 4, foi em muitos dos animais o dia após cirurgia, o que pode ter despoletado um aumento da FC relacionado ao stress ou desconforto.

A VFC pode também ser avaliada através do SDNN (Gráfico 12) e pelo RMSSD (Gráfico 13), sendo 2 parâmetros utilizados para deteção de atividade simpática e parassimpática. No caso do SDNN, podemos ver que este parâmetro se manteve relativamente estável ao longo dos 5 dias. Segundo a literatura, cavalos com valores contantes de SDNN mais elevados, em comparação com outros cavalos, têm uma maior flexibilidade autonómica e maior adaptação ao stress (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020). O RMSSD demonstra a mesma estabilidade que o anterior (Bohák *et al.*, 2018). Segundo alguns autores, tanto o SDNN como o RMSSD, num episódio de stress diminuem, assim, visto ambos os parâmetros se notarem contantes ao longo dos dias, podemos presumir que os cinco dias de hospitalização nestes cavalos, não foram suficientes para originar uma discrepância entre o sistema simpático e parassimpático capaz de ser observada (Chung *et al.*, 2022; Nyerges-Bohák *et al.*, 2025).

Tanto o LF (Gráfico 14) como o HF (Gráfico 15) comportaram-se de forma idêntica. Este resultado não foi o esperado uma vez que, com o estímulo inicial de stress, era de esperar a sobreposição do sistema simpático sobre o parassimpático, ocorrendo então um aumento do LF e uma diminuição do HF (Gehlen, Faust, *et al.*, 2020; Gehlen, Loschelder, *et al.*, 2020; Rietmann *et al.*, 2004). Neste caso ocorreu um aumento de ambos do dia 1 para o dia 2, sendo mais acentuado no LF. Entre os dias 2 e 4 o LF e o HF mantiveram-se relativamente constantes, e entre o dia 4 e 5 ambos os parâmetros voltaram a subir, tendo mais uma vez o LF uma subida superior. Este facto poderá traduzir que não houve um desequilíbrio duradouro entre o sistema simpático e parassimpático ou, que não possível na análise da VFC observar o momento de adaptação ao stress durante o período deste estudo, visto que a compensação feita pelo SNP é bastante rápida.

Segundo a literatura, o VLF (Gráfico 16) é considerado sensível ao stress e a estados de recuperação em cavalos, sendo um indicador de mudanças no sistema autónomo (Mendonça *et al.*, 2020; Szabó *et al.*, 2021; Wonghanchao *et al.*, 2024). Normalmente este componente, numa situação de stress demonstra o mesmo comportamento que o HF, diminuindo (Usui & Nishida, 2017). Neste caso, observamos uma subida entre o dia 1 e 2, isto pode significar que, no dia 1 devido ao estímulo de stress este parâmetro diminuiu, e com o repouso e a redução do estímulo de stress, regressou ao seu estado basal. Do dia 3 para o dia 5 houve uma diminuição, podendo dever-se ao facto de muitos destes animais terem sido expostos a procedimentos médicos invasivos, induzindo um novo pico de stress.

Quanto ao rácio LF/HF (Gráfico 17) observou-se um pico no dia 2 ($\pm 2,5$), descendo de seguida para um valor estável ($\pm 1,5$). Apesar de estar descrito que o valor normal deste rácio num cavalo em repouso é $0,5 \pm 0,2$, apenas um artigo o descreve, sendo que existe bastante discrepância entre a restante literatura, não havendo consenso quanto ao valor de referência (Santosuosso *et al.*, 2025). Se considerarmos estes valores de referência, apesar de se ter observado um pico no dia 2, a qualidade do repouso pode nunca ter sido satisfatória, uma vez que o valor mais baixo observado é ainda bastante elevado comparando com os valores basais de um cavalo em repouso. Apesar disso, ressaltar que existem artigos em que valor basal encontra-se num intervalo bastante mais elevado não sendo então possível retirar estas conclusões (Louie *et al.*, 2023; Mendonça, Bienboire-Frosini, Kowalczyk, *et al.*, 2019; Mendonça, Bienboire-Frosini, Menuge, *et al.*, 2019).

Relativamente às correlações observadas entre MMP-9 e o LF (Gráfico 18), não foram encontradas descrições de uma possível correlação, ainda assim pode ser indicativo de que o parâmetro LF pode ter alguma relação com a inflamação e com padrões inflamatórios. Futuras investigações sobre o tema seriam necessárias para compreender plenamente esta relação.

A correlação entre os leucócitos e os neutrófilos (Gráfico 19) é já conhecida, uma vez que os neutrófilos são células que fazem parte dos leucócitos e que representam uma percentagem alta dentro desta família celular (Rosales, 2020; Rosales *et al.*, 2016)

Neste estudo foram observados 16 animais, sendo uma população de dimensão bastante reduzida, o que dificulta a análise estatística e aumenta o grau de incerteza dos resultados. No que toca à recolha das amostras biológicas, sangue e saliva, devido a problemas logísticos não foi possível as mesmas transitarem para o laboratório no mesmo dia, havendo a possibilidade de diminuição da qualidade das mesmas. No que toca à recolha dos parâmetros cardíacos, apesar do método utilizado ter sido bastante útil, houve perdas de informação, podendo ter sido devido à utilização de operadores diferentes na execução do procedimento.

Ainda como limitação ao presente estudo é o carácter inovador dos biomarcadores de inflamação plasmáticos (MMP-9 e IL-6). Estando ainda pouco caracterizados em equinos é importante rever-se a metodologia e o contexto de aplicação antes de descartar ou considerar válidos estes parâmetros.

Por fim, este projeto deu início a um estudo que deve ser continuado, uma vez que o stress e a inflamação podem atrasar e/ou piorar a recuperação dos animais, sendo ambos desafios na gestão do paciente e preocupações recorrentes do corpo clínico. A avaliação de vários biomarcadores poderá oferecer novas pistas científicas que facilitem o estabelecimento

de diagnósticos e prognósticos mais precisos e céleres. A compreensão da fisiologia do stress, assim como os estímulos indutores de stress em ambiente de hospitalização permitirá o desenvolvimento de condições hospitalares direcionadas para o bem-estar animal.

Conclusão

Este estudo permitiu concluir que, no momento da admissão hospitalar, os equinos apresentam sinais de stress psicológico, ainda que de forma moderada. Esta resposta parece ser uma reação aguda ao transporte, novo ambiente e às alterações associadas ao processo de internamento.

Verificou-se uma tendência para estabilização de parâmetros como a VFC entre os dias 2 e 3 de hospitalização, o que sugere um grau de adaptação por parte dos animais ao novo contexto. Contudo, foi observada uma nova destabilização destes mesmos parâmetros entre os dias 3 e 4, coincidindo com o período pós-cirúrgico de grande parte dos equinos avaliados, o que evidencia o impacto dos procedimentos invasivos e da recuperação cirúrgica sobre o equilíbrio fisiológico dos equinos.

Relativamente à utilização da saliva como método não invasivo para avaliação de biomarcadores, os resultados obtidos indicam que, no caso dos marcadores de stress, o cortisol é um parâmetro que pode ser avaliado na saliva, já a serotonina é necessária uma investigação mais robusta neste sentido, não sendo possível aferir que a saliva é uma alternativa viável e comparável à análise sanguínea. No que diz respeito aos biomarcadores inflamatórios, a eficácia da saliva como meio de diagnóstico mostrou-se menos consistente, sugerindo que não poderá substituir, os métodos convencionais baseados em amostras sanguíneas.

Este estudo sublinha, por conseguinte, a relevância de ter em conta o impacto da hospitalização enquanto fator potencial de stress em equinos e reafirma a necessidade de uma monitorização contínua durante o período de internamento. Futuramente, será essencial aprofundar esta linha de investigação com estudos de maior dimensão e duração, de modo a clarificar de forma mais robusta a real extensão do impacto do internamento hospitalar sobre o bem-estar dos equinos, bem como avaliar, com maior precisão, as vantagens e limitações da saliva como ferramenta de diagnóstico clínico não invasiva em Medicina Veterinária Equina.

Referências bibliográficas:

- Acero, E. J., Gallego, J. J., Leon, H. H., Botero, D. A., & Melo, C. E. (2019). Molecular Bases For High (Hf) And Low Frequency (Lf) Bands: A New Approach To Heart Rate Variability Analysis. *The Faseb Journal*, 33(S1), Lb488–Lb488. https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb488
- Agorastos, A., & Chrousos, G. P. (2022). The neuroendocrinology of stress: the stress-related continuum of chronic disease development. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 27, Issue 1, pp. 502–513). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01224-9>
- Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Piccione, G., Fazio, F., Cirincione, R., Cassata, G., & Cicero, L. (2023). Inflammatory-like status and acute stress response in horses after road transport. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37069-1>
- Arrigo, F., Aragona, F., Faggio, C., Giudice, E., Giannetto, C., Piccione, G., Rizzo, M., & Arfuso, F. (2024). Monitoring the physiological inflammatory alertness in horse after road transport. *Veterinary Research Communications*. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10459-0>
- Astruc, T., & Terlouw, E. M. C. (2023). Towards the use of on-farm slaughterhouse. In *Meat Science* (Vol. 205). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109313>
- Atata, J. A., Ajadi, A. A., Adam, M., Olatunji, A. O., Bisalla, M., & Adamu, S. (2025). Comparative Evaluation of Hemato-biochemical and Oxidative Parameters of Racing Horses. *Media Kedokteran Hewan*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.20473/mkh.v36i1.2025.1-12>
- Aurich, J., Wulf, M., Ille, N., Erber, R., von Lewinski, M., Palme, R., & Aurich, C. (2015). Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 52, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.01.003>

- Ayala, I., Martos, N. F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J. G., & Illera, J. C. (2012). Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.013>
- B. Riley, C., E. Cregier, S., & F. Fraser. Andrew. (2022). *Fraser's The Behaviour and Welfare of the Horse, 3rd Edition* (C. makepeace, Ed.; 3rd ed.). <https://doi.org/DOI:10.1079/9781789242133.0001>
- Baburathinam, D., Shyamsundar, D., Babu, N., Nagarajan, K., Vijayalkshmi, D., & K, D. (2019). Expresssion Of Serum And Salivary Mmp-1 And Mmp-9 In Oral Cancer, Oral Potentially Malignant Disorders And Normals. *Journal Of Biomedical And Pharmaceutical Research*, 8. <https://doi.org/10.32553/Jbpr.V8i3.619>
- Bartolomé, E., Sánchez, M. J., Molina, A., Schaefer, A. L., Cervantes, I., & Valera, M. (2013). Using eye temperature and heart rate for stress assessment in young horses competing in jumping competitions and its possible influence on sport performance. *Animal*, 7(12), 2044–2053. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001626>
- Barton, A.-K., Richter, I.-G., Ahrens, T., Merle, R., Alalwani, A., Lilge, S., Purschke, K., Barnewitz, D., & Gehlen, H. (2021). MMP-9 Concentration in Peritoneal Fluid Is a Valuable Biomarker Associated with Endotoxemia in Equine Colic. *Mediators of Inflammation*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/9501478>
- Barton, M. H., & Collatos, C. (1999). Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 Activity and Endotoxin Concentration in Peritoneal Fluid and Blood of Horses with Acute Abdominal Disease. In *J Vet Intern Med* (Vol. 13).
- Baum, A. (1990). Stress, Intrusive Imagery, and Chronic Distress. In *HEALTH PSYCHOLOGY* (Issue 6).

- Bazzano, M., Marchegiani, A., La Gualana, F., Petriti, B., Spaterna, A., & Laus, F. (2024). Salivary analysis to unveil the paradigm of stress of domestic horses reared in the wild. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62172-2>
- Besnier, E., Clavier, T., & Compere, V. (2017). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anesthetics: A review. In *Anesthesia and Analgesia* (Vol. 124, Issue 4, pp. 1181–1189). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001580>
- Bishop, R. C., Graham, S. M., Connolly, S. L., Wilkins, P. A., & McCoy, A. M. (2024). Systematic evaluation supports the use of ELISA for quantification of calprotectin in equine feces, a first step toward noninvasive quantification of intestinal inflammation in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 85(9). <https://doi.org/10.2460/ajvr.24.04.0110>
- Bohák, Z., Harnos, A., Joó, K., Szenci, O., & Kovács, L. (2018). Anticipatory response before competition in Standardbred racehorses. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201691>
- Borovkov, S., Borovkova, V., & Suetskyi, O. (2024). The State Of The Immune System Of Horses In Conditions Of Stress. *The Scientific And Technical Bulletin Of The Institute Of Animal Science Naas Of Ukraine*, 131, 32–39. <https://doi.org/10.32900/2312-8402-2024-131-32-39>
- Brunyé, T. T., Goring, S. A., Navarro, E., Hart-Pomerantz, H., Grekin, S., McKinlay, A. M., & Plessow, F. (2025). Identifying the most effective acute stress induction methods for producing SAM- and HPA-related physiological responses: a meta-analysis. *Anxiety, Stress, & Coping*, 38(3), 263–285. <https://doi.org/10.1080/10615806.2025.2450620>
- Bruschetta, G., Zanghi, G., Giunta, R. P., Ferlazzo, A. M., Satué, K., D'Ascola, A., & Fazio, E. (2024). Short Road Transport and Slaughter Stress Affects the Expression Profile of Serotonin Receptors, Adrenocortical, and Hematochemical Responses in Horses. *Veterinary Sciences*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/vetsci11030113>

- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Holgate, S. T., Jönsson, L. S., Latulippe, M. E., Marcos, A., Moreines, J., Mrini, C., Müller, M., Pawelec, G., Van Neerven, R. J. J., Watzl, B., & Zhao, J. (2013). A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *British Journal of Nutrition*, 109(SUPPL. S1). <https://doi.org/10.1017/S0007114512005119>
- Carroll, S. L., Sykes, B. W., & Mills, P. C. (2022). Moving toward Fear-Free Husbandry and Veterinary Care for Horses. In *Animals* (Vol. 12, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12212907>
- Cerasoli, F., Vulpiani, M. P., Saluti, G., Conte, A., Ricci, M., Savini, G., & D'alterio, N. (2022). Assessment of Welfare in Groups of Horses with Different Management, Environments and Activities by Measuring Cortisol in Horsehair, Using Liquid Chromatography Coupled to Hybrid Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry. *Animals*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/ani12141739>
- Chabaud, C., Mathieu, M., Brooks, E., & Bienboire-Frosini, C. (2018). *APPLICATION NOTE: Validation of a Serotonin ELISA Kit with Blood Samples from Three Domestic Animal Species*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28997.55524>
- Chen, J. W., Stefanovski, D., Haughan, J., Jiang, Z., Boston, R., Soma, L. R., & Robinson, M. A. (2020). Inflammatory mediators are potential biomarkers for extracorporeal shockwave therapy in horses. *Equine Veterinary Journal*, 52(3), 449–454. <https://doi.org/10.1111/evj.13183>
- Chen, S., Wu, A., Shen, X., Kong, J., & Huang, Y. (2025). Disrupting the dangerous alliance: Dual anti-inflammatory and anticoagulant strategy targets platelet-neutrophil crosstalk in sepsis. *Journal of Controlled Release*, 379, 814–831. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.053>
- Chevalier, C. M., Krampert, L., Schreckenbach, M., Schubert, C. F., Reich, J., Novak, B., Schmidt, M. V., Rutten, B. P. F., & Schmidt, U. (2021). MMP9 mRNA is a potential

- diagnostic and treatment monitoring marker for PTSD: Evidence from mice and humans. *European Neuropsychopharmacology*, 51, 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.04.014>
- Choi, W., Moon, J. H., & Kim, H. (2020). Serotonergic regulation of energy metabolism in peripheral tissues. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 245, Issue 1, pp. R1–R10). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0546>
- Christensen, J. W., Keeling, L. J., & Nielsen, B. L. (2005). Responses of horses to novel visual, olfactory and auditory stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, 93(1–2), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.06.017>
- Chrousos, G. P., Papadopoulou-Marketou, N., Bacopoulou, F., Lucafò, M., Gallotta, A., & Boschiero, D. (2022). Photoplethysmography (PPG)-determined heart rate variability (HRV) and extracellular water (ECW) in the evaluation of chronic stress and inflammation. *Hormones*, 21(3), 383–390. <https://doi.org/10.1007/s42000-021-00341-y>
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Awosika, A. O., & Ayers, D. (2024). Physiology, Stress Reaction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Chung, H. A., Lee, K. E., Kim, J. G., Do, K.-T., & Kim, B. S. (2022). Study on the stress relief effect of buffer rein for the beginner riders in horseback riding. *Animal Industry and Technology*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.5187/ait.2022.9.1.1>
- Cole, A. B., Montgomery, K., Bale, T. L., & Thompson, S. M. (2022). What the hippocampus tells the HPA axis: Hippocampal output attenuates acute stress responses via disynaptic inhibition of CRF+ PVN neurons. *Neurobiology of Stress*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100473>
- Cortese, L., Christopherson, P. W., & Pelagalli, A. (2020). Platelet function and therapeutic applications in dogs: Current status and future prospects. In *Animals* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10020201>

- Costa, G. L., Tabbi, M., Bruschetta, G., Spadola, F., Leonardi, F., Bruno, F., Iannelli, N. M., Licata, P., Macrì, F., Passino, E. S., Macrì, D., & Interlandi, C. (2024). Analgesic efficacy of tapentadol in chronic joint disorders in horses: plasma serotonin concentration and adrenocortical response as biomarkers of pain-induced stress. *Frontiers in Veterinary Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1505398>
- Cywińska, A., Wyszyńska, Z., Górecka, R., Szarska, E., Witkowski, L., Dziekan, P., Winnicka, A., & Schollenberger, A. (2010). The effect of the 162 km endurance ride on equine peripheral blood neutrophil and lymphocyte functions. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(2), 279–285. <https://consensus.app/papers/the-effect-of-the-162-km-endurance-ride-on-equine-peripheral-szarska-witkowski/7933c8b22ce050169fc20c04202ee4f8/>
- Davis, S. L., Latimer, M., & Rice, M. (2023). Biomarkers of Stress and Inflammation in Children. *Biological Research For Nursing*, 25(4), 559–570. <https://doi.org/10.1177/10998004231168805>
- De Deurwaerdère, P., & Di Giovanni, G. (2020). Serotonin in health and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21103500>
- De Santis, M., Contalbrigo, L., Borgi, M., Cirulli, F., Luzi, F., Redaelli, V., Stefani, A., Toson, M., Odore, R., Vercelli, C., Valle, E., & Farina, L. (2017). Equine assisted interventions (EAIs): Methodological considerations for stress assessment in horses. In *Veterinary Sciences* (Vol. 4, Issue 3). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/vetsci4030044>
- Desta, T. (2023). Maintaining traditional values and looking for novel uses assure equines' survival as a species. *Equine Veterinary Education*. <https://doi.org/10.1111/eve.13921>
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1997). Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity In Vivo: A Potential Role For Leukocyte Trafficking. In *Brain, Behavior, And Immunity* (Vol. 11).

- Dhama, K., Latheef, S. K., Dadar, M., Samad, H. A., Munjal, A., Khandia, R., Karthik, K., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Bhatt, P., Chakraborty, S., Singh, K. P., Iqbal, H. M. N., Chaicumpa, W., & Joshi, S. K. (2019). Biomarkers in stress related diseases/disorders: Diagnostic, prognostic, and therapeutic values. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00091>
- Dickerson, S. S., & Kemeny, M. E. (2004). Acute stressors and cortisol responses: A theoretical integration and synthesis of laboratory research. In *Psychological Bulletin* (Vol. 130, Issue 3, pp. 355–391). <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.3.355>
- Ditzen, B., Germann, J., Meuwly, N., Bradbury, T. N., Bodenmann, G., & Heinrichs, M. (2019). Intimacy as Related to Cortisol Reactivity and Recovery in Couples Undergoing Psychosocial Stress. *Psychosomatic Medicine*, 81(1), 16–25. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000633>
- Djordjevic, B., Morales-Lange, B., Press, C. M., Olson, J., Lagos, L., Mercado, L., & Øverland, M. (2021). Comparison of circulating markers and mucosal immune parameters from skin and distal intestine of atlantic salmon in two models of acute stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms22031028>
- Dong, F., Sefcik, J. S., Euler, E., & Hodgson, N. A. (2025). Measuring salivary cortisol in biobehavioral research: A systematic review and methodological considerations. In *Brain, Behavior, and Immunity - Health* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100936>
- El-Deeb, W., Fayez, M., Elsohaby, I., Mkrtchyan, H. V., & Alhaider, A. (2020). Changes in blood biomarkers in Arabian horses with *Clostridium difficile*-induced enterocolitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101525>
- El-Deeb, W., Iacob, O., Fayez, M., Elgiouhy, M., Shawaf, T., & Ibrahim, A. (2018). Acute phase proteins, interleukin-6, tumor necrosis factor, nitric oxide and oxidative stress

- markers in horses with cutaneous habronemosis under field condition. *Veterinary Parasitology*, 255, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.023>
- Esco, M. R., Williford, H. N., Flatt, A. A., Freeborn, T. J., & Nakamura, F. Y. (2018). Ultra-shortened time-domain HRV parameters at rest and following exercise in athletes: an alternative to frequency computation of sympathovagal balance. *European Journal of Applied Physiology*, 118(1), 175–184. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3759-x>
- Fábián, B., Horváth, I. F., Shemirani, A. H., & Csiki, Z. (2022). Depression and Anxiety Symptoms Are Associated with Mean Platelet Volume in Autoimmune Disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph191711006>
- Feng, Y., Chang, P., Liu, J., & Zhang, W. sheng. (2024). Effects and mechanisms of perioperative medications on the hypothalamic pituitary adrenal response to surgical injury: A narrative review. In *Journal of Clinical Anesthesia* (Vol. 94). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2023.111367>
- Fietz, S., Einspanier, R., Höppner, S., Hertsch, B., & Bondzio, A. (2008). Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. *Equine Veterinary Journal*, 40(3), 266–271. <https://doi.org/10.2746/042516408X251921>
- Flethøj, M., Kanters, J. K., Pedersen, P. J., Haugaard, M. M., Carstensen, H., Olsen, L. H., & Buhl, R. (2016). Appropriate threshold levels of cardiac beat-to-beat variation in semi-automatic analysis of equine ECG recordings. *BMC Veterinary Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0894-2>
- Fureix, C., Jegou, P., Sankey, C., & Hausberger, M. (2009). How horses (*Equus caballus*) see the world: Humans as significant “objects.” *Animal Cognition*, 12(4), 643–654. <https://doi.org/10.1007/s10071-009-0223-2>

- Galluzzi, L., Yamazaki, T., & Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11). <https://doi.org/10.1038/s41580-018>
- Gasparian, A. Y., Ayvazyan, L., Mukanova, U., Yessirkepov, M., & Kitas, G. D. (2019). The platelet-to-lymphocyte ratio as an inflammatory marker in rheumatic diseases. In *Annals of Laboratory Medicine* (Vol. 39, Issue 4, pp. 345–357). Seoul National University, Institute for Cognitive Science. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.4.345>
- Ge, L., Liu, S., Li, S., Yang, J., Hu, G., Xu, C., & Song, W. (2022). Psychological stress in inflammatory bowel disease: Psychoneuroimmunological insights into bidirectional gut–brain communications. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016578>
- Gehlen, H., Faust, M. D., Grzeskowiak, R. M., & Trachsel, D. S. (2020). Association between disease severity, heart rate variability (HRV) and serum cortisol concentrations in horses with acute abdominal pain. *Animals*, 10(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani10091563>
- Gehlen, H., Loschelder, J., Merle, R., & Walther, M. (2020). Evaluation of stress response under a standard euthanasia protocol in horses using analysis of heart rate variability. *Animals*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/ani10030485>
- Geng, S., Chen, D., Wang, Y., Yu, X., Zuo, D., Lv, X., Zhou, X., Hu, C., Yang, X., Ma, X., Hu, W., Xi, J., & Yu, S. (2023). Serum levels of Vanin-2 increase with obesity in relation to inflammation of adipose tissue and may be a predictor of bariatric surgery outcomes. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1270435>
- Ghosh Anindita Guha, D. (2023). Platelet Serotonin Level: An Essential Role in Human Behavior, Stress Reaction and the Selection of Psychotropic Drugs. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 12(7), 1771–1777. <https://doi.org/10.21275/sr23724030720>
- Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & Umeoka, E. H. de L. (2018). A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical

- implications. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Górecka-Bruzda, A., Jastrzębska, E., Earley, B., Jaworski, Z., Stryjek, R., Suwała, M., & Czycholl, I. (2025). Behavioural and physiological indicators of hoof trimming stress in restrained juvenile stable- and forest-born Konik Polski horses: A cross-sectional and longitudinal field study. *Applied Animal Behaviour Science*, 282. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2024.106461>
- Hall, S. A., Farish, M., Coe, J., Baker, E., Camerlink, I., Lawrence, A. B., & Baxter, E. M. (2021). Minimally invasive biomarkers to detect maternal physiological status in sow saliva and milk. *Animal*, 15(11). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100369>
- Hammen, C., Kim, E. Y., Eberhart, N. K., & Brennan, P. A. (2009). Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. *Depression and Anxiety*, 26(8), 718–723. <https://doi.org/10.1002/da.20571>
- Hassamal, S. (2023). Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1130989>
- Helle, M., Boeije, L., de Groot, E., de Vos, A., & Aarden, L. (1991). Sensitive ELISA for interleukin-6: Detection of IL-6 in biological fluids: synovial fluids and sera. *Journal of Immunological Methods*, 138(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90063-L](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90063-L)
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Herman, J. P., Nawreen, N., Smail, M. A., & Cotella, E. M. (2020). Brain mechanisms of HPA axis regulation: neurocircuitry and feedback in context Richard Kvetnansky lecture. In

- Stress* (Vol. 23, Issue 6, pp. 617–632). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1859475>
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 29, Issue 8, pp. 1201–1213). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006>
- Hovey, M. R., Davis, A., Chen, S., Godwin, P., & Porr, C. A. S. (2021). Evaluating Stress in Riding Horses: Part One—Behavior Assessment and Serum Cortisol. *Journal of Equine Veterinary Science*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103297>
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). *The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis** (Vol. 12, Issue 2).
- Jaedicke, K., Taylor, J., & Preshaw, P. (2012). Validation and quality control of ELISAs for the use with human saliva samples. *Journal of Immunological Methods*, 377, 62–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.01.010>
- James, V. H. T., Horner, M. W., Moss, M. S., & Rippon, A. E. (1970). Adrenocortical Function In The Horse. *Journal Of Endocrinology*, 48(3), 319–335.
<https://doi.org/10.1677/Joe.0.0480319>
- Janczarek, I., Stachurska, A., Kędzierski, W., Pawlak, E. W., Wilk, I., Zyglewska, K., Paszkowska, A., Ryżak, M., & Wiśniewska, A. (2021). Heart rate variability in Konik and purebred Arabian horses in response to different predator vocalisations. *Animal*, 15(1).
<https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100045>
- Janczarek, I., Stachurska, A., Kędzierski, W., Wiśniewska, A., Ryżak, M., & Koziół, A. (2020). The intensity of physiological and behavioral responses of horses to predator vocalizations. *BMC Veterinary Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02643-6>

- Jasim, H., Ghafouri, B., Gerdle, B., Hedenberg-Magnusson, B., & Ernberg, M. (2020). Altered levels of salivary and plasma pain related markers in temporomandibular disorders. *Journal of Headache and Pain*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s10194-020-01160-z>
- Jayasinghe, S. U., Hall, S. J., Torres, S. J., & Turner, A. I. (2022). Stress system dysfunction revealed by integrating reactivity of stress pathways to psychological stress in lean and overweight/obese men. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 322(2), R144–R151. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00276.2021>
- Jeong, J.-J., Ganesan, R., Jin, Y.-J., Park, H., Min, B., Jeong, M., Yoon, S., Choi, M., Choi, J., Moon, J., Min, U., Lim, J.-H., Lee, D., Han, S., Ham, Y., Kim, B.-Y., & Suk, K. T. (2023). Multi-strain probiotics alleviate loperamide-induced constipation by adjusting the microbiome, serotonin, and short-chain fatty acids in rats. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1174968>
- Jonnakuty, C., & Gragnoli, C. (2008). What do we know about serotonin? In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 217, Issue 2, pp. 301–306). <https://doi.org/10.1002/jcp.21533>
- Joseph, D. N., & Whirledge, S. (2017). Stress and the HPA axis: Balancing homeostasis and fertility. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>
- Kanova, M., & Kohout, P. (2021). Serotonin—its synthesis and roles in the healthy and the critically ill. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22094837>
- Kim, J., Park, Y., Kim, E. J., Jung, H., & Yoon, M. (2021). Relationship between oxytocin and serotonin and the fearfulness, dominance, and trainability of horses. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(2), 453–460. <https://doi.org/10.5187/JAST.2021.E29>
- Kim, R. (2017). Anesthetic technique and cancer recurrence in oncologic surgery: unraveling the puzzle. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(1), 159–177. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9647-8>

- Kim, R. (2018). Effects of surgery and anesthetic choice on immunosuppression and cancer recurrence. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1389-7>
- Kim, S., Choi, Y., Kim, J., Wickens, C., & Yoon, M. (2025). Soybean oil supplement induces increased approaching behavior to humans and alters serotonin concentrations in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 146, 105361. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2025.105361>
- Klecel, W., & Martyniuk, E. (2021). From the eurasian steppes to the roman circuses: A review of early development of horse breeding and management. In *Animals* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11071859>
- Knezevic, E., Nenic, K., Milanovic, V., & Knezevic, N. N. (2023). The Role of Cortisol in Chronic Stress, Neurodegenerative Diseases, and Psychological Disorders. In *Cells* (Vol. 12, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12232726>
- König, U., Visser, E. K., & Hall, C. (2017). Indicators of stress in equitation. *Applied Animal Behaviour Science*, 190, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.02.018>
- Koudouovoh-Tripp, P., Hüfner, K., Egeter, J., Kandler, C., Giesinger, J. M., Sopper, S., Humpel, C., & Sperner-Unterweger, B. (2021). Stress Enhances Proinflammatory Platelet Activity: the Impact of Acute and Chronic Mental Stress. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 16(2), 500–512. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09945-4>
- Kusov, P. A., Kotelevtsev, Y. V., & Drachev, V. P. (2023). Cortisol Monitoring Devices toward Implementation for Clinically Relevant Biosensing In Vivo. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28052353>
- Kuwahara, M., Hiraga, A., Kai, M., Tsubone, H., & Sugano, S. (1999). Influence of training on autonomic nervous function in horses: evaluation by power spectral analysis of heart rate

- variability. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 30, 178–180.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb05213.x>
- Lai Carlo, A. P. (2015). Stress Response to Surgery, Anesthetics Role and Impact on Cognition. *Journal of Anesthesia & Clinical Research*, 06(07). <https://doi.org/10.4172/2155-6148.1000539>
- Lee, G., & Yoon, M. (2021). Association of plasma concentrations of oxytocin, vasopressin, and serotonin with docility and friendliness of horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106482>
- Lesimple, C. (2020). Indicators of horse welfare: State-of-the-art. In *Animals* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10020294>
- Lewis, J., & Elder, P. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma Cortisol. *Journal of Steroid Biochemistry*, 22, 673–676. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90222-5](https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90222-5)
- Librado, P., Fages, A., Gaunitz, C., Leonardi, M., Wagner, S., Khan, N., Hanghøj, K., Alquraishi, S. A., Alfarhan, A. H., Al-Rasheid, K. A., Der Sarkissian, C., Schubert, M., & Orlando, L. (2016). The evolutionary origin and genetic makeup of domestic horses. In *Genetics* (Vol. 204, Issue 2, pp. 423–434). Genetics Society of America. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194860>
- Librado, P., Gamba, C., Gaunitz, C., Sarkissian, C. Der, Pruvost, M., Albrechtsen, A., Fages, A., Khan, N., Schubert, M., Jagannathan, V., Serres-Armero, A., Kuderna, L. F. K., Povolotskaya, I. S., Seguin-Orlando, A., Lepetz, S., Neuditschko, M., Thèves, C., Alquraishi, S., Alfarhan, A. H., ... Orlando, L. (2017). Ancient genomic changes associated with domestication of the horse Downloaded from. In *Science* (Vol. 356). <http://science.sciencemag.org/>
- Librado, P., Khan, N., Fages, A., Kusliy, M. A., Suchan, T., Tonasso-Calvière, L., Schiavinato, S., Alioglu, D., Fromentier, A., Perdereau, A., Aury, J. M., Gaunitz, C., Chauvey, L.,

- Seguin-Orlando, A., Der Sarkissian, C., Southon, J., Shapiro, B., Tishkin, A. A., Kovalev, A. A., ... Orlando, L. (2021). The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*, 598(7882), 634–640. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>
- Lippi, G., Henry, B. M., & Favaloro, E. J. (2021). Mean Platelet Volume Predicts Severe COVID-19 Illness. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (Vol. 47, Issue 4, pp. 456–459). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1727283>
- Lisman, T. (2018). Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 371, Issue 3, pp. 567–576). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2727-4>
- Liu, Q., Zhu, W., Wen, X., & Da, Y. (2025). The Role of Platelet–Neutrophil Interactions in Driving Autoimmune Diseases. In *Immunology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/imm.13901>
- Lo Martire, V., Caruso, D., Palagini, L., Zoccoli, G., & Bastianini, S. (2020). Stress & sleep: A relationship lasting a lifetime. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 117, pp. 65–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.08.024>
- Louie, E. W., Berryhill, E. H., Nieto, J., Wensley, F., Knych, H., Finno, C. J., & Morgan, J. M. (2023). Changes in Heart Rate Variability with Induction of Gastric Ulcers in Adult Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104192>
- Lykkegaard, K., Lauritzen, B., Tessem, L., Weikop, P., & Svendsen, O. (2005). Local anaesthetics attenuates spinal nociception and HPA-axis activation during experimental laparotomy in pigs. *Research in Veterinary Science*, 79(3), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.11.017>

- Macnicol, J. L., Michael, X., Lindinger, I., & Pearson, W. (2018). A time-course evaluation of inflammatory and oxidative markers following high-intensity exercise in horses: a pilot study. *J Appl Physiol*, 124, 860–865. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00461.2017.-Ex>
- Madrigal-Trejo, D., Sánchez-Pérez, J., Espinosa-Asuar, L., Valdivia-Anistro, J. A., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2023). A Metagenomic Time-Series Approach to Assess the Ecological Stability of Microbial Mats in a Seasonally Fluctuating Environment. *Microbial Ecology*, 86(4), 2252–2270. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02231-9>
- Mandel, J., Casari, M., Stepanyan, M., Martyanov, A., & Deppermann, C. (2022). Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073868>
- Marsland, A. L., Walsh, C., Lockwood, K., & John-Henderson, N. A. (2017). The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 64, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.011>
- Martín-Cuervo, M., Gracia-Calvo, L. A., Macías-García, B., Ezquerro, L. J., & Barrera, R. (2022). Evaluation of Eosinopenia as a SIRS Biomarker in Critically Ill Horses. *Animals*, 12(24). <https://doi.org/10.3390/ani12243547>
- McDuffee, L., Mills, M., McNiven, M., & Montelpare, W. (2019). Establishing statistical stability for heart rate variability in horses. *Journal of Veterinary Behavior*, 32, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2019.05.003>
- McEwen, B. S. (2019). What Is the Confusion With Cortisol? In *Chronic Stress* (Vol. 3). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/2470547019833647>
- Mcgonagle, K. A., & Kessler, R. C. (1990). Chronic Stress, Acute Stress, and Depressive Symptoms x. In *American Journal of Community Psychology* (Vol. 18, Issue 5).

- McNicholas, K., Francois, M., Liu, J.-W., Doecke, J., Hecker, J., Faunt, J., Maddison, J., Johns, S., Pukala, T., Rush, R., & Leifert, W. (2022). Salivary inflammatory biomarkers are predictive of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease in a feasibility study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1019296>
- Meijler, F. L., Kroneman, J., van der Tweel, I., Herbschleb, J. N., Heethaar, R. M., & Borst, C. (1984). Nonrandom ventricular rhythm in horses with atrial fibrillation and its significance for patients. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 4, Issue 2, pp. 316–323). [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(84\)80220-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(84)80220-X)
- Mendonça, T., Bienboire-Frosini, C., Kowalczyk, I., Leclercq, J., Arroub, S., & Pageat, P. (2019). Equine activities influence horses' responses to different stimuli: Could this have an impact on equine welfare? *Animals*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/ani9060290>
- Mendonça, T., Bienboire-Frosini, C., Menuge, F., Leclercq, J., Lafont-Lecuelle, C., Arroub, S., & Pageat, P. (2019). The impact of equine-assisted therapy on equine behavioral and physiological responses. *Animals*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070409>
- Mendonça, T., Bienboire-Frosini, C., Sanchez, N., Kowalczyk, I., Teruel, E., Descout, E., & Pageat, P. (2020). de la Guérinière was right: Shoulder-in is beneficial for the physical and mental states of horses. *Journal of Veterinary Behavior*, 38, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2020.05.003>
- Miller, A. B., Harris, P. A., Barker, V. D., & Adams, A. A. (2021). Short-term transport stress and supplementation alter immune function in aged horses. *PLoS ONE*, 16(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254139>
- Miller, R., Wojtyniak, J. G., Weckesser, L. J., Alexander, N. C., Engert, V., & Lehr, T. (2018). How to disentangle psychobiological stress reactivity and recovery: A comparison of model-based and non-compartmental analyses of cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology*, 90, 194–210. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.019>
- Montgomery, K. E., Basha, M., Nyholm, L., Smith, C., Ananiev, G., Fedorov, A., Kapoor, A., Brown, R., Capitini, C., & Kwekkeboom, K. (2024). Exploring Inflammation and Stress

- as Biological Correlates of Symptoms in Children With Advanced Cancer: A Longitudinal Feasibility Study. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology Nursing*, 41(3), 157–171. <https://doi.org/10.1177/27527530231214544>
- Muhammad, A. T. (2024). The Socio-Economic Retrieval of Horse in Northern Nigeria. *Dundaye Journal of Hausa Studies*, 3(01), 82–92. <https://doi.org/10.36349/djhs.2024.v03i01.010>
- Munoz, M. L., Van Roon, A., Riese, H., Thio, C., Oostenbroek, E., Westrik, I., De Geus, E. J. C., Gansevoort, R., Lefrandt, J., Nolte, I. M., & Snieder, H. (2015). Validity of (Ultra-)Short recordings for heart rate variability measurements. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138921>
- Musazzi, L., Tornese, P., Sala, N., & Popoli, M. (2017). Acute or Chronic? A Stressful Question. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 40, Issue 9, pp. 525–535). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.07.002>
- .
- Nikitin, G., Semenov, B., Guseva, V., Kuznetsova, T., Nazarova, A., Ladanova, M., & Khomenko, R. (2022). Correlation of the pulse rate in horses at the start with the results of endurance ride. *The FASEB Journal*, 36(S1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7928>
- Nyerges-Bohák, Z., Kovács, L., Povázsai, Á., Hamar, E., Póti, P., & Ladányi, M. (2025). Heart rate variability in horses with and without severe equine asthma. *Equine Veterinary Journal*, 57(3), 611–618. <https://doi.org/10.1111/evj.14414>
- Oliveira, T. M., Zanutto, G. M., Trindade, P. H. E., & Baccarin, R. Y. A. (2025). Environment change causes a transient adverse impact on horse behavioral resting patterns. *Applied Animal Behaviour Science*, 282. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2024.106482>

- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 753, pp. 2–18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Ortiz-Guzmán, J. E., Mollà-Casanova, S., Serra-Añó, P., Arias-Mutis, Ó. J., Calvo, C., Bizy, A., Alberola, A., Chorro, F. J., & Zarzoso, M. (2023). Short-Term Heart Rate Variability in Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 12, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/jcm12186051>
- Pawluski, J., Jegu, P., Henry, S., Bruchet, A., Palme, R., Coste, C., & Hausberger, M. (2017). Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*). *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182257>
- Pazhani, J., Chanthu, K., Jayaraman, S., & Varun, B. (2023). Evaluation of salivary MMP-9 in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia using ELISA. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 27, 649–654. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_426_23
- Pearson, G., Waran, N., Reardon, R. J. M., Keen, J., & Dwyer, C. (2021). A Delphi study to determine expert consensus on the behavioural indicators of stress in horses undergoing veterinary care. *Applied Animal Behaviour Science*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105291>
- Peeters, M., Sulon, J., Beckers, J. F., Ledoux, D., & Vandenheede, M. (2011). Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal*, 43(4), 487–493. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x>
- Perek, S., Nussinovitch, U., Sagi, N., Gidron, Y., & Raz-Pasteur, A. (2023). Prognostic implications of ultra-short heart rate variability indices in hospitalized patients with infective endocarditis. *PLoS ONE*, 18(6 JUNE). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287607>

- Poochipakorn, C., Wonghanchao, T., Sanigavatee, K., & Chanda, M. (2024). Stress Responses in Horses Housed in Different Stable Designs during Summer in a Tropical Savanna Climate. *Animals*, 14(15). <https://doi.org/10.3390/ani14152263>
- Popescu, S., & Diugan, E. A. (2017). The relationship between the welfare quality and stress index in working and breeding horses. *Research in Veterinary Science*, 115, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.07.028>
- Pourhamzeh, M., Moravej, F. G., Arabi, M., Shahriari, E., Mehrabi, S., Ward, R., Ahadi, R., & Joghataei, M. T. (2022). The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 42, Issue 6, pp. 1671–1692). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01064-9>
- Radley, J. J., & Johnson, S. B. (2018). Anteroventral bed nuclei of the stria terminalis neurocircuitry: Towards an integration of HPA axis modulation with coping behaviors - Curt Richter Award Paper 2017. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 89, pp. 239–249). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.005>
- Radley, J. J., & Sawchenko, P. E. (2011). A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *Journal of Neuroscience*, 31(26), 9683–9695. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6040-10.2011>
- Rankins, E. M., Manso Filho, H. C., Malinowski, K., & McKeever, K. H. (2022). Muscular tension as an indicator of acute stress in horses. *Physiological Reports*, 10(6). <https://doi.org/10.14814/phy2.15220>
- Raulo, S. M., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Pirilä, E., & Maisi, P. (2001). MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Veterinary Journal*, 33(2), 128–136. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2001.tb00590.x>
- Rietmann, T. R., Stuart, A. E. A., Bernasconi, P., Stauffacher, M., Auer, J. A., & Weishaupt, M. A. (2004). Assessment of mental stress in warmblood horses: Heart rate variability in

- comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(1–2), 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.016>
- Rioja-Lang, F. C., Connor, M., Bacon, H., & Dwyer, C. M. (2020). Determining a welfare prioritization for horses using a delphi method. *Animals*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ani10040647>
- Rohleder, N. (2019). Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 105, pp. 164–171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.021>
- Rosales, C. (2020). Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 108, 377–396. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
- Rosales, C., Demareux, N., Lowell, C., & Uribe-Querol, E. (2016). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1469780>
- Roth-Isigkeit, A., Dibbelt, L., Schmucker, P., & Seyfarth, M. (2000). The Immune-Endocrine Interaction Varies with the Duration of the Inflammatory Process in Cardiac Surgery Patients. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 12)
- Roy, M. P., Kirschbaum, C., & Steptoe, A. (2001). Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 26). www.elsevier.com/locate/psyneuen
- Rudics, E., Buzás, A., Pálfi, A., Szabó, Z., Nagy, Á., Hompoth, E. A., Dombi, J., Bilicki, V., Szendi, I., & Dér, A. (2025). Quantifying Stress and Relaxation: A New Measure of Heart Rate Variability as a Reliable Biomarker. *Biomedicines*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines13010081>
- Ruet, A., Lemarchand, J., Parias, C., Mach, N., Moisan, M. P., Foury, A., Briant, C., & Lansade, L. (2019). Housing horses in individual boxes is a challenge with regard to welfare. *Animals*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/ani9090621>

- Ruparelia, N., Chai, J. T., Fisher, E. A., & Choudhury, R. P. (2017). Inflammatory processes in cardiovascular disease: A route to targeted therapies. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 133–144). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.185>
- Russell, A. L., Tasker, J. G., Lucion, A. B., Fiedler, J., Munhoz, C. D., Wu, T. yiao J., & Deak, T. (2018). Factors promoting vulnerability to dysregulated stress reactivity and stress-related disease. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 30, Issue 10). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jne.12641>
- Santosuosso, E., Léguillette, R., Shoemaker, S., Baumwart, R., Temple, S., Hemmerling, K., Kell, T., & Bayly, W. (2025). A consort-guided randomized, blinded, controlled clinical trial on the effects of 6 weeks training on heart rate variability in thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 39(1). <https://doi.org/10.1111/jvim.17253>
- Schmucker, S., Preisler, V., Marr, I., Krüger, K., & Stefanski, V. (2022). Single housing but not changes in group composition causes stress-related immunomodulations in horses. *PLoS ONE*, 17(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272445>
- Scholler, D., Zablotzki, Y., & May, A. (2023). Evaluation of Substance P as a New Stress Parameter in Horses in a Stress Model Involving Four Different Stress Levels. *Animals*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ani13071142>
- Schrimpf, A., Single, M. S., & Nawroth, C. (2020). Social referencing in the domestic horse. *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010164>
- Senanayake, G. B., & Arambepola, C. (2019). Understanding chronic stress: a narrative review of literature. *Journal of the College of Community Physicians of Sri Lanka*, 25(1), 30. <https://doi.org/10.4038/jccpsl.v25i1.8196>

- Share, E. R., Mastellar, S. L., Suagee-Bedore, J. K., & Eastridge, M. L. (2024). Validation of a Commercial ELISA Kit for Non-Invasive Measurement of Biologically Relevant Changes in Equine Cortisol Concentrations. *Animals*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/ani14192831>
- Shawaf, T., El-Deeb, W. M., & Elgioushy, M. (2020). The Contribution of Specific and Nonspecific Biomarkers in Diagnosis of Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) Under Field Condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102853>
- Shoraba, M., Shoulah, S. A., Arnaout, F., & Selim, A. (2024). Equine Trypanosomiasis: Molecular Detection, Hematological, and Oxidative Stress Profiling. *Veterinary Medicine International*, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/6550276>
- Sikorska, U., Maško, M., Ciesielska, A., Zdrojkowski, Ł., & Domino, M. (2023). Role of Cortisol in Horse's Welfare and Health. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agriculture13122219>
- Smeets, M. M. J., Vandenbossche, P., Duijst, W. L. J. M., Mook, W. N. K. A. van, & Leers, M. P. G. (2021). Validation of a new method for saliva cortisol testing to assess stress in first responders. *Emergency Medicine Journal*, 38(4), 297–302. <https://doi.org/10.1136/emered-2019-209205>
- Smulders, T. V. (2021). Telencephalic regulation of the HPA axis in birds. *Neurobiology of Stress*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100351>
- Smyth, J., Zawadzki, M., & Gerin, W. (2013). Stress and disease: A structural and functional analysis. *Social and Personality Psychology Compass*, 7(4), 217–227. <https://doi.org/10.1111/spc3.12020>
- Snow, D. H., Ricketts, S. W., & Mason, D. K. (1983). Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte

- response. *Equine Veterinary Journal*, 15(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01742.x>
- Soslau, G. (2022). Cardiovascular Serotonergic System: Evolution, Receptors, Transporter, And Function. *Journal Of Experimental Zoology Part A: Ecological And Integrative Physiology*, 337(2), 115–127. <https://doi.org/10.1002/Jez.2554>
- Souza, M. (N.D.). *Ufrj Programa De Pós-Graduação Em Medicina Veterinária (Patologia E Ciências Clínicas)*.
- Steptoe, A., Hamer, M., & Chida, Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: A review and meta-analysis. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 21, Issue 7, pp. 901–912). <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.03.011>
- Stokol, T. (2020). Hematology Red Flags: The Value of Blood Smear Examination in Horses. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 36, Issue 1, pp. 15–33). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.11.001>
- Strzelec, K., Kankofer, M., & Pietrzak, S. (2011). Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. *Acta Veterinaria Brno*, 80(1), 101–105. <https://doi.org/10.2754/avb201180010101>
- Szabó, C., Vizesi, Z., & Vincze, A. (2021). Heart rate and heart rate variability of amateur show jumping horses competing on different levels. *Animals*, 11(3), 1–8. <https://doi.org/10.3390/ani11030693>
- Taylor, P. M. (1989). Equine stress responses to anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, 63(6), 702–709. <https://doi.org/10.1093/bja/63.6.702>
- ter Woort, F., Dubois, G., Tansley, G., Didier, M., Verdegaaal, E. L., Franklin, S., & Van Erck-Westergren, E. (2023). Validation of an equine fitness tracker: ECG quality and arrhythmia detection. *Equine Veterinary Journal*, 55(2), 336–343. <https://doi.org/10.1111/evj.13565>

- Thomas, B. L., Claassen, N., Becker, P., & Viljoen, M. (2019). Validity of Commonly Used Heart Rate Variability Markers of Autonomic Nervous System Function. *Neuropsychobiology*, 78(1), 14–26. <https://doi.org/10.1159/000495519>
- Thomsson, O., Ström-Holst, B., Sjunnesson, Y., & Bergqvist, A. S. (2014). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay developed for measuring cortisol concentration in human saliva and serum for its applicability to analyze cortisol in pig saliva. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 55. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0055-1>
- Timothy Treal Taylor, W., Librado, P., Hunska Tašunke Icu Chief Joseph American, M., Gonzalez, M., Means, B., High Crane, S., Dull Knife Mah, B., Keyaké Wih, piya, Wih, W., Tecumseh Collin Wanka, C., Kiya, tuya, Ward, C., Pasqual, T. A., Chauvey, L., Tonasso-Calviere, L., Schiavinato, S., Seguin-Orlando, A., Fages, A., Khan, N., ... Orlando, L. (n.d.). *Chief Gover 1,5 †, Jimmy Arterberry 6 †, Anpetu Luta Wih (Antonia Loretta Afraid of Bear-Cook) 4 , Akil Nujipi (Harold Left Heron) 7 , Tanka Omniya*. <https://www.science.org>
- Trevelyan, S. J., Brewster, J. L., Burgess, A. E., Crowther, J. M., Cadell, A. L., Parker, B. L., Croucher, D. R., Dobson, R. C. J., Murphy, J. M., & Mace, P. D. (2020). Structure-based mechanism of preferential complex formation by apoptosis signal-regulating kinases. In *Sci. Signal* (Vol. 13). <http://stke.sciencemag.org/>
- Triguinho, A., Fontes-Sousa, A. P., Pimenta, J., & Cotovio, M. (2023). Electrocardiographic Reference Values in Clinically Healthy Lusitano Horses. *Veterinary Sciences*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/vetsci10080518>
- Turner, A. I., Smyth, N., Hall, S. J., Torres, S. J., Hussein, M., Jayasinghe, S. U., Ball, K., & Clow, A. J. (2020). Psychological stress reactivity and future health and disease outcomes: A systematic review of prospective evidence. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 114). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104599>

- Usui, H., & Nishida, Y. (2017). The very low-frequency band of heart rate variability represents the slow recovery component after a mental stress task. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182611>
- Van Reeth, O., Weibel, L., Spiegel, K., Leproult, R., Dugovic, C., & Maccari, S. (2000). Interactions between stress and sleep: From basic research to clinical situations. In *Sleep Medicine Reviews* (Vol. 4, Issue 2, pp. 201–219). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1053/smr.1999.0097>
- van Spijk, J. N., Lo, H. C., Merle, R., Richter, I. G., Diemar, A., Stoeckle, S. D., & Gehlen, H. (2023). Serum and Urinary Matrix Metalloproteinase-9 Concentrations in Dehydrated Horses. *Animals*, 13(24). <https://doi.org/10.3390/ani13243776>
- Vignesh, V., Castro-Dominguez, B., James, T. D., Gamble-Turner, J. M., Lightman, S., & Reis, N. M. (2024). Advancements in Cortisol Detection: From Conventional Methods to Next-Generation Technologies for Enhanced Hormone Monitoring. In *ACS Sensors* (Vol. 9, Issue 4, pp. 1666–1681). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c01912>
- Villalba-Orero, M., Contreras-Aguilar, M. D., Cerón, J. J., Fuentes-Romero, B., Valero-González, M., & Martín-Cuervo, M. (2024). Association between Eosinophil Count and Cortisol Concentrations in Equids Admitted in the Emergency Unit with Abdominal Pain. *Animals*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ani14010164>
- Wagner, A. E. (2010). Effects of Stress on Pain in Horses and Incorporating Pain Scales for Equine Practice. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 26, Issue 3, pp. 481–492). <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2010.07.001>
- Weidenfeld, J., & Ovadia, H. (2017). The Role of the Amygdala in Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. In *The Amygdala - Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67828>

- White, A. G., Elias, E., Orozco, A., Robinson, S. A., & Manners, M. T. (2024). Chronic Stress-Induced Neuroinflammation: Relevance of Rodent Models to Human Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25105085>
- White-Springer, S. (2021). PSX-A-8 Late-Breaking: Development of multiplex assays for equine cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF α . *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.1093/jas/skab235.680>
- WHO. (2023, February 21). *Stress - What is stress?*
- Wonghanchao, T., Sanigavatee, K., Poochipakorn, C., Huangsak Sri, O., Yalong, M., Pongpuk, K., Thanadom, K., Iertsakkongkul, P., Lappolpaibul, K., Deethong, N., & Chanda, M. (2024). Impact of different cooling solutions on autonomic modulation in horses in a novice endurance ride. *Animal*, 18(4). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101114>
- Yun, H.-S., Kim, J.-P., Kim, E.-J., Kim, B.-G., & Jeong, H.-J. (2022). A rapid ELISA for the detection of matrix metalloproteinase 9 using a recombinant Fab-type antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 636(Pt 1), 184–189.
- Zhang, W. H., Zhang, J. Y., Holmes, A., & Pan, B. X. (2021). Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity. In *Biological Psychiatry* (Vol. 89, Issue 9, pp. 847–856). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.026>

Anexos:

Estes 2 resumos foram aceites e apresentados como flash presentation no IV Encontro de Investigação da FMV- ULusófona dia 07 de julho de 2025 na Universidade Lusófona.



Estudo preliminar de novos marcadores inflamatórios em cavalos hospitalizados: IL6 e MMP9

Tomás Casqueiro¹, José Prazeres^{1,2}, Gesiane Ribeiro^{1,2,3}, Ana Lima^{1,2,3}, Filipe R. Ramos^{4,5}, Tiago Mendonça^{1,2,3}

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa

² I-MVET - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

³ CECAV - Centro de Investigação Animal e Veterinária, Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

⁴ CEaul - Centro de Estatística e Aplicações da Universidade de Lisboa

⁵ Faculdade de Ciências Sociais e Tecnologia, Universidade Europeia

Objetivos: Marcadores inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6) e a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) são amplamente reconhecidos na medicina humana e veterinária como marcadores de inflamação. O objetivo deste estudo foi investigar estes marcadores em cavalos hospitalizados, no momento da admissão e da alta, assim como a sua correlação entre diferentes amostras biológicas: sangue e saliva.

Materiais e Métodos: Foram hospitalizados 15 cavalos para procedimentos eletivos. Realizaram-se duas colheitas de sangue e duas de saliva (dia 1=admissão; dia 5=alta), de acordo com o protocolo hospitalar em vigor. A recolha de sangue foi realizada em tubos Vacutainer EDTA®, enquanto a saliva foi recolhida em salivettes®. As amostras foram conservadas refrigeradas até à entrega no laboratório e, em seguida, congeladas a -80 °C, para posterior análise laboratorial. As análises foram realizadas com recurso a kits ELISA: Human IL-6; Equine MMP-9. Foram realizados testes *t* para comparar os resultados entre os dias 1 e 5 e correlações de *Pearson* para compreender a relação das concentrações dos marcadores no sangue e na saliva.

Resultados: Relativamente ao teste *t*, os dados não apresentaram variabilidade entre a admissão e a alta ($p>0,05$). Observou-se uma tendência para uma correlação positiva da IL-6 na admissão ($r=0,477$; $p=0,062$). Os restantes resultados não foram significativos.

Conclusões: A ausência de alterações entre a admissão e a alta poderá ser justificada pelo carácter eletivo dos procedimentos realizados nos cavalos incluídos. Seria interessante repetir estas análises em cavalos hospitalizados com condições inflamatórias evidentes. O estudo tem como limitação a dimensão da população, acrescida pelo facto de se ter observado um desvio padrão considerável, podendo ser a causa da ausência de correlação de MMP-9 e IL-6. A continuação deste estudo ajudará a compreender melhor a correlação destes marcadores nas diferentes matrizes biológicas.

Palavras-chave: Inflamação; hospitalização; equinos; IL-6; MMP-9

Alterações do Volume Plaquetário Médio em Cavalos com Estereotipias: Análise Comparativa com Cavalos Normais

Inês Rolo¹, Gesiane Ribeiro^{1,2,3}, José Prazeres^{1,2}, Tomás Casqueiro¹,
Ricardo Agrícola^{1,2,4}, Tiago Mendonça^{1,2,3}

¹ FMV/ULHT - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Lisboa, PT

² I-MVET, FMV, Universidade Lusófona

³ CECAV - Centro de Ciência Animal e Veterinária, Universidade Lusófona, Lisboa/PT.

⁴ CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Lisboa, PT

Objetivos: Avaliar se existem diferenças entre vários marcadores sanguíneos entre cavalos em vários estados clínicos (cavalos com estereotipias, problemas ortopédicos, cavalos reativos, cavalos saudáveis), explorando o VPM como possível biomarcador associado a stress psicológico.

Materiais e Métodos: Foram recolhidas amostras sanguíneas de 28 cavalos, no âmbito de exames médicos de rotina, para realização de hemograma completo. As amostras de sangue foram colhidas em tubos com EDTA e processadas nos equipamentos IDEXX Procyte™ One de acordo com as recomendações do fabricante. Tendo em conta a reduzida dimensão da população, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas entre pares.

Resultados: Observou-se uma diferença significativa do VPM entre os grupos de cavalos ($p < 0,05$). Especificamente, os cavalos com estereotipias (E) apresentaram um resultado superior aos cavalos saudáveis (S) ($E = 9,04 \text{ fL}$; $S = 8,31 \text{ fL}$; $p < 0,05$).

Conclusões: A literatura sugere que valores aumentados de VPM podem refletir ativação plaquetária em resposta a stress, inflamação ou exercício. Os resultados indicam que o VPM poderá constituir um marcador hematológico relevante na avaliação de cavalos com estereotipias, suportando a hipótese de que estas manifestações comportamentais têm repercussões fisiológicas mensuráveis. Sendo a população uma limitação do presente estudo, recomenda-se a confirmação destes resultados em estudos futuros, assim como noutros quadros clínicos de doença comportamental.

Palavras-chave: Estereotipias, Volume Plaquetário Médio, Equino, Hematologia, Stress

Financiamento: I-MVET

Este resumo foi aceite para comunicação livre na 7^o Reunião Anual do Congresso Europeu de Medicina do Comportamento e Bem-Estar animal que irá ocorrer entre os dias 18 e 19 de setembro de 2025, em Helsinquia, Finlândia.

Increased mean platelet volume in horses displaying behavioural problems.

Poster + teaser

Behavioural Medicine

Tomás Casqueiro¹, José Prazeres¹, Gesiane Ribeiro^{1,2}, Ricardo Agrícola^{1,3} João Borges^{1,4}, Inês Rolo¹, Filipe R. Ramos^{5,6}, Tiago Mendonça^{1,2}.

¹I-MVET, Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University – Lisbon University Centre

²Veterinary and Animal Research Centre (CECAV), Lusófona University – Lisbon University Centre

³Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (Ciisa), Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon University

⁴MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, Évora

⁵CEAUL, Centre for Statistics and Applications of the University of Lisbon

⁶Faculty of Social Sciences and Technology, European University

tomas.casqueiro@hotmail.com

The authors have no conflict of interest to declare.

The physiology of behavioural problems in horses is still scarcely known. The increase in mean platelet volume (MPV) associated with symptoms of depression and anxiety has been described in human medicine. This study aimed to investigate MPV and its relationship with behavioural problems in horses.

A total of 32 horses were included and divided in groups as follows: control (12); stereotypies (5); orthopaedics (3); reactivity while getting ready to ride (5); and reactivity while ridden (3). Whole blood was collected from the jugular vein and refrigerated until further analysis. The sample was analysed by IDEXX® ProCyte Dx equipment. Results were compared with the Kruskal-Wallis test and pairwise comparisons.

MPV differed between groups ($p < 0.05$). Significant differences were observed between the control group (8.2 ± 0.54 fL) and the following groups: stereotypies (9 ± 0.44 fL, $p < 0.05$); reactivity while getting ready to ride (9.4 ± 0.69 fL, $p < 0.01$); and reactivity while ridden (9.5 ± 0.83 fL, $p < 0.05$). A trend was observed between the control group and the orthopaedics groups (9.2 ± 1.05 fL, $p = 0.06$).

MPV was higher in the studied groups when compared to the control group. Thus, MPV, as in human medicine, might be an interesting indicator for the study of behavioural problems in horses. Further studies are needed to allow a full understanding of the clinical relevance of this indicator.