



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Veterinària

**CAVALLS PARTICIPANTS EN LES FESTES PATRONALS DE MENORCA: CARACTERITZACIÓ  
FISIOLÒGICA DE LA RESPOSTA D'ESTRÈS I PROTOCOL D'AVALUACIÓ DEL SEU  
BENESTAR**

Memòria presentada per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina i Sanitat

Animals per:

*Sergi Olvera Maneu*

i

Dirigida per:

*Dr. Manel López Béjar i Dra. Annaïs Carbajal Brossa*

Presentada al Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Facultat de  
Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, juliol 2022



El Dr. Manel López Béjar, professor titular d'universitat del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Annaïs Carbajal Brossa, investigadora del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona certifiquen:

Que la memòria titulada "***Cavalls participants en les festes patronals de Menorca: caracterització fisiològica de la resposta d'estrès i protocol d'avaluació del seu benestar***", presentada per Sergi Olvera Maneu amb la finalitat d'optar al grau de Doctor en Medicina i Sanitat Animals, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació perquè sigui jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signen la present a Bellaterra, juliol de 2022.

Dr. Manel López-Béjar

Dra. Annaïs Carbajal Brossa

Sergi Olvera Maneu  
(Doctorand)



Per a la realització de la present tesi doctoral l'autor va gaudir d'una beca predoctoral de personal investigador en formació (PIF) atorgada pel departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Addicionalment, es va comptar amb el finançament de l'Ajuntament de Maó i el Consell Insular de Menorca.



*“Ha estat un hivern llarg i dur, com una tramuntanada que semblava que s’ho havia d’endur tot, la identitat, les il·lusions, les alegries i les esperances. Però com les alzines del camp de Menorca es fan més fortes amb els embats, les nostres arrels, com la nostra festa, estan encara ben vives”*

**C. Mesquida**

**Resposta de l'abadessa de Santa Clara al prec del Caixer Senyor (2013)**





*“En català es pot escriure, també, per un cert esperit de revolta”*

**M. Rodoreda**

**Carta a Joan Sales (1962).**



## TAULA DE CONTINGUTS

RESUM.....	I
RESUMEN.....	II
SUMMARY.....	III
INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ.....	1
REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	7
OBJECTIUS.....	41
HIPÒTESI.....	45
CAPÍTOL I.....	49
<i>“Hair Cortisol, Testosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Their Ratios in Stallions as a Retrospective Measure of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal and Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axes Activity: Exploring the Influence of Seasonality”</i>	
CAPÍTOL II .....	69
<i>“Variations of Cortisol and Hematological Parameters to Estimate the Physiological Stress Response in Horses Following a Training Session to Participate in a Traditional Equestrian Event”</i>	
CAPÍTOL III .....	91
<i>“Salivary Cortisol Variations to Estimate the Physiological Stress Response in Horses at Menorca Patronal Festivals”</i>	
CAPÍTOL IV.....	111
<i>“Protocol d’Avaluació del Benestar dels Cavalls Participants en les Festes Patronals de Menorca”</i>	
DISCUSSIÓ GENERAL.....	139
CONCLUSIONS.....	155



## ABREVIATURES

	CATALÀ	ANGLÈS
ACTH	Hormona adrenocorticotròpica	Adrenocorticotropic hormone
C	-	Cortisol
CBG	Globulina transportadora de corticosteroides	Corticosteroid-binding globulin
CRH	Hormona alliberadora de corticotropina	Corticotropin-releasing hormone
DHEA	Deshidroepiandrosterona	Dehydroepiandrosterone
DHEA-S	Sulfat de deshidroepiandrosterona	Dehydroepiandrosterone Sulfate
GnRH	Hormona alliberadora de gonadotropina	Gonadotropin-releasing hormone
HCC	-	Hair Cortisol Concentration
HTC	-	Hair Testosterone Concentration
HHA	Hipotalàmic- Hipofisiari -Adrenal	-
HHG	Hipotalàmic-Hipofisiari-Gonadal	-
HPA	-	Hypothalamic–Pituitary–Adrenal
HPG	-	Hypothalamic–Pituitary–Gonadal
SAM	Simpàtric-Adrenal-Medul·lar	-
T	-	Testosterone



# RESUM

Els cavalls s'han utilitzat per a diverses finalitats al llarg de la història. Aquest fet, i motivat per un increment d'interès substancial per part de la societat en el benestar dels animals, ha propiciat en els últims anys l'estudi i caracterització de la resposta d'estrès que es genera en els animals destinats a participar en activitats recreatives. Des d'almenys el s. XIV a Menorca, cada estiu, se celebren les festes en honor als patrons dels pobles que conformen l'Illa, on el cavall n'és el protagonista principal. Durant les festes patronals els cavalls es poden exposar a una sèrie de factors que poden ser potencialment estressants. Conèixer quin és l'efecte d'aquesta exposició és una primera aproximació per determinar el grau d'impacte a nivell fisiològic que tenen les celebracions en els cavalls que hi participen. En el primer estudi de la present tesi doctoral es van mesurar les variacions estacionals de cortisol, testosterona i sulfat de deshidroepiandrosterona (DHEA-S) i les seves ràtios en pèl al llarg d'un any com a mesura retrospectiva de l'activitat dels eixos hipotalàmic-hipofisiari-adrenal i gonadal. Els resultats d'aquest estudi van mostrar un efecte estacional per totes les hormones avaluades i també per les seves ràtios. A diferència de l'observat en les concentracions de testosterona i DHEA-S, les concentracions de cortisol van mostrar un increment progressiu des de l'hivern fins a l'estiu. El segon estudi es va realitzar amb la finalitat d'estimar la resposta d'estrès a través de l'anàlisi del cortisol salival, plasmàtic, i un estudi hematològic complet durant una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals de l'Illa. Els resultats obtinguts van mostrar com les concentracions de cortisol salival i plasmàtic incrementaven significativament després d'una hora d'entrenament en comparació als nivells obtinguts previs a la sessió. Paral·lelament es va reportar el retorn de les concentracions de cortisol als seus nivells basals més ràpidament en saliva en comparació amb el plasma. Aquesta troballa suggereix l'ús de la saliva com una millor matriu per a monitorar el retorn als nivells de cortisol basal en cavalls exposats a un exercici. El tercer estudi tenia l'objectiu d'estimar la resposta d'estrès mitjançant l'anàlisi del cortisol salival en cavalls durant la celebració de les festes patronals de Maó (Menorca, Espanya). Per primera vegada, aquest estudi descrivia la resposta d'estrès generada per la participació dels animals en els actes. Els resultats van mostrar com les concentracions de cortisol salival augmentaven progressivament, assolint les concentracions màximes el segon dia de les celebracions, i tornant als valors basals l'endemà dels actes, suggerint les celebracions com un estressor agut i transitori. En quart lloc, es va dissenyar, adaptar i establir l'aplicació d'un protocol d'avaluació del benestar dels cavalls participats en les festes patronals de Menorca. Pel disseny del protocol es va realitzar una adaptació dels protocols prèviament validats per l'avaluació del benestar de cavalls utilitzats per activitats recreatives i esportives i que tractés de garantir un enfocament holístic que compregués les diferents dimensions del benestar animal. En el protocol proposat es van incloure 4 principis, 8 criteris i 16 indicadors basats en l'animal i l'ambient. En conclusió, la present tesi doctoral ofereix una base experimental per avaluar de forma objectiva la resposta d'estrès i el benestar de cavalls destinats a participar en activitats culturals i tradicionals.



# RESUMEN

Los caballos han sido utilizados para diversos fines a lo largo de la historia. Este hecho y motivado por un incremento de interés substancial por parte de la sociedad en el bienestar animal, ha propiciado en los últimos años el estudio y caracterización de la respuesta de estrés que se genera en animales destinados a participar en actividades recreativas. Desde por lo menos el S. XIV en Menorca, cada verano se celebran las fiestas patronales en honor a los patronos de los pueblos que conforman la Isla, en donde el caballo es el protagonista principal. Durante las fiestas patronales, los caballos pueden ser expuestos a una serie de factores que pueden ser potencialmente estresantes. Conocer cuál es el efecto de esta exposición es una primera aproximación para determinar el impacto a nivel fisiológico que tienen las celebraciones en los caballos que participan. En el primer capítulo de la presente tesis doctoral se midieron las variaciones estacionales de cortisol, testosterona y sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) y sus ratios en pelo a lo largo de un año como medida retrospectiva de la actividad de los ejes hipotalámico-hipofisario-adrenal y gonadal. Los resultados de este estudio mostraron un efecto estacional en todas las hormonas evaluadas, así como también en sus ratios. A diferencia de lo observado en las concentraciones de testosterona y DHEA-S, las concentraciones de cortisol mostraron un incremento progresivo desde invierno hasta verano. El segundo estudio se realizó con el fin de estimar la respuesta fisiológica de estrés mediante la cuantificación del cortisol salival y plasmático, y las variaciones en la biometría hemática en caballos durante una sesión de entrenamiento estándar para participar en las fiestas patronales de Menorca. Los resultados obtenidos mostraron como las concentraciones de cortisol salival y plasmático incrementaban significativamente después de una hora de entrenamiento en comparación a los niveles previos al mismo. Paralelamente se reportó el retorno de las concentraciones de cortisol a sus niveles basales más rápidamente en saliva en comparación con el plasma. Este hallazgo sugiere el uso de la saliva como una mejor matriz para monitorizar el retorno a los niveles de cortisol basal en caballos expuestos a un ejercicio. El tercer estudio tenía el objetivo de estimar la respuesta fisiológica de estrés mediante la medida del cortisol salival en caballos durante la celebración de las fiestas patronales de Maó (Menorca, España). Por primera vez, este estudio describía la respuesta de estrés generada por la participación de los animales en los actos. Los resultados nos mostraron como las concentraciones de cortisol salival aumentaron progresivamente, obteniendo las concentraciones máximas en el segundo día de las celebraciones, y volviendo a los valores basales al día siguiente a los actos, postulando así las celebraciones como un estresor agudo y transitorio. En cuarto lugar, se diseñó, adaptó y estableció la aplicación de un protocolo de evaluación del bienestar de los caballos participantes en las fiestas patronales de Menorca. Para el diseño del protocolo se realizó una adaptación de los protocolos previamente validados para la evaluación del bienestar de caballos utilizados para fines recreativos y deportivos para garantizar un enfoque holístico que comprendiera las diferentes dimensiones del bienestar animal. En el protocolo propuesto se incluyeron 4 principios, 8 criterios y 16 indicadores basados en el animal y en el ambiente. En conclusión, la presente tesis doctoral ofrece una base experimental para evaluar de forma objetiva la respuesta de estrés y el bienestar de caballos destinados a participar en actividades culturales y tradicionales.

## SUMMARY

Historically horses have been used for different tasks and purposes, including recreational activities. In a more animal welfare-conscious society, the use of horses for human-related purposes has motivated the study and characterization of their stress response. Since the XIV<sup>th</sup> century, horses have been the main character in Menorca's patronal festivals. In these traditional festivals, horses may be exposed to potentially stressful factors. Studying the effect of this exposure is a first approach to determine the physiological impact of the celebrations on the participant horses. In the first study of the present thesis, cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) seasonal variations and their ratios were assessed as a retrospective measure of the hypothalamic-hypophysis-adrenal and gonadal axis activity. Results showed a seasonal effect on all the evaluated hormones and their ratios. Contrary to testosterone and DHEA-S, cortisol concentrations increased progressively from winter to summer. The second study was performed to evaluate the stress response by measuring saliva and serum cortisol and the variations of the complete blood count during a training session for the festivals. Results showed a significant increase in salivary and plasma cortisol levels after an hour of training compared to the baseline levels. Salivary cortisol concentrations returned faster to baseline than serum, suggesting this as a better return-to-baseline cortisol measurement matrix in exercised horses. The objective of the third study was to evaluate the physiological stress response by measuring the salivary cortisol levels on patronal festivals in Maó (Menorca, Spain). Results showed how salivary cortisol levels raised to a maximum peak on the festival's second day and decreased to baseline levels within the day after the end of the festival. This finding suggests that festivals generated an acute and transitory stress response. Lastly, an animal welfare protocol was designed, adapted, and implemented for participating horses in the Menorca patronal festivals. Previous welfare validated protocols were used as a model for the design to ensure a more holistic and complete approach to animal welfare. The designed protocol included 4 principles, 8 criteria, and 16 indicators based on "animal-based" and "resource-based" indicators. Overall, the present thesis offers an experimental basis to objectively assess the stress response and welfare of horses used in cultural and traditional activities.



# INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ



El cavall és un atleta extraordinari amb una alta capacitat de resistència adquirida i desenvolupada com a resultat de la seva evolució [1]. La domesticació i posterior millora d'aquesta espècie mitjançant la cria selectiva ha potenciat aquestes característiques permetent així la seva adaptació a una gran varietat d'usos segons les seves aptituds [1,2]. Així, l'ús del cavall ha evolucionat al llarg de la història i ho ha fet en paral·lel als avenços tecnològics i canvis socials [2]. De ser mitjans de transport, animals de guerra i eines de treball, els cavalls han passat, en les últimes dècades, a utilitzar-se en la seva majoria per activitats recreatives i esportives [3]. En alguns llocs, però, els cavalls es segueixen utilitzant amb finalitats tradicionals com és el cas de l'Illa de Menorca (Illes Balears, Espanya). Des d'almenys el S.XIV a Menorca, cada estiu, es celebren les festes en honor als patrons dels pobles que conformen l'Illa, on el cavall n'és el protagonista principal [4]. En els últims anys l'interès de la societat en el benestar animal, entès com un terme dinàmic, multidisciplinari i d'interès públic, ha incrementat substancialment [5,6], i les festes patronals de Menorca no han defugit de l'evolució i conscienciació social en la matèria. Per aquest motiu l'estudi del benestar animal, des de totes les seves vessants, en els cavalls participants en les festes patronals de Menorca ha esdevingut un tema transcendental pel manteniment i millora de les celebracions.

Durant les festes patronals els cavalls poden ser exposats a una sèrie de factors potencialment estressants. Conèixer quin és l'efecte d'aquesta exposició és una primera aproximació per determinar el grau d'impacte a nivell fisiològic que tenen les celebracions en els cavalls que hi participen [7–9]. L'estrès, entès d'es d'un punt de vista fisiològic com una reacció de l'organisme per mantenir el seu equilibri [10,11], es pot mesurar mitjançant diversos indicadors [8]. Quan un animal percep una amenaça, entre d'altres, el seu organisme desencadena una resposta fisiològica que culmina amb l'alliberament de glucocorticoides, unes hormones que tenen la funció principal de restablir el desequilibri generat en l'organisme després de la percepció d'un estressor [12,13]. Així doncs, el cortisol, el glucocorticoide principal en la majoria de mamífers, s'ha utilitzat àmpliament com un indicador de la resposta fisiològica a l'estrès [14,15]. El cortisol es pot mesurar en diverses matrius, i la més comunament utilitzada ha sigut la sang [15]. En les últimes dècades, però, la recerca de noves matrius per mesurar les concentracions hormonals de forma no invasiva ha anat guanyant terreny. En conseqüència, la determinació hormonal amb la seva corresponent validació en matrius com la saliva, el pèl, les femtes o la orina, ha esdevingut una important àrea d'estudi de la fisiologia de l'estrès [14–16]. En menor proporció també s'han utilitzat altres hormones esteroidals com a potencials indicadors d'estrès incloent la testosterona o el sulfat de deshidroepiandrosterona [17–19]. Tal i com s'ha exposat anteriorment, de les diverses aproximacions a l'estudi de la resposta d'estrès en cavalls, els indicadors fisiològics i més

concretament les hormones esteroidals han sigut uns dels indicadors més utilitzats en equitació en els últims temps. No obstant això, la caracterització fisiològica de la resposta d'estrès dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca resta per ser explorada. Per altra banda, avaluar el grau de benestar dels cavalls durant les celebracions, i corregir aquells aspectes deficitaris en la matèria, és un factor indispensable per la millora i adaptació de les celebracions a les demandes actuals de la societat. Els protocols permeten desenvolupar eines per l'avaluació del benestar dels individus implicats d'una manera objectiva i des d'un punt de vista científic i pràctic [20]. Per aquest motiu, el disseny i aplicació d'un protocol d'avaluació del benestar animal dissenyat i aplicat específicament a les celebracions permetria la determinació del benestar dels animals participants de forma objectiva i pràctica.

En conseqüència, la present tesi doctoral s'ha realitzat amb els objectius de **(1)** caracteritzar les variacions estacionals de cortisol, testosterona i sulfat de deshidroepiandrosterona i les seves ràtios en pèl al llarg d'un any com a mesura retrospectiva de l'activitat dels eixos hipotalàmic-hipofisiari-adrenal i gonadal, **(2)** caracteritzar la resposta d'estrès a través de l'anàlisi del cortisol salival, plasmàtic, i un estudi hematològic complet en cavalls durant una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals de Menorca, **(3)** caracteritzar la resposta d'estrès mitjançant l'anàlisi del cortisol salival en cavalls durant la celebració de les festes patronals de Maó, i **(4)** dissenyar, descriure i adaptar l'aplicació d'un protocol que permeti l'avaluació del benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca de forma objectiva i pràctica. Els objectius exposats prèviament es veuen plasmats en els Capítols I, II, III, i IV de la present tesi doctoral.

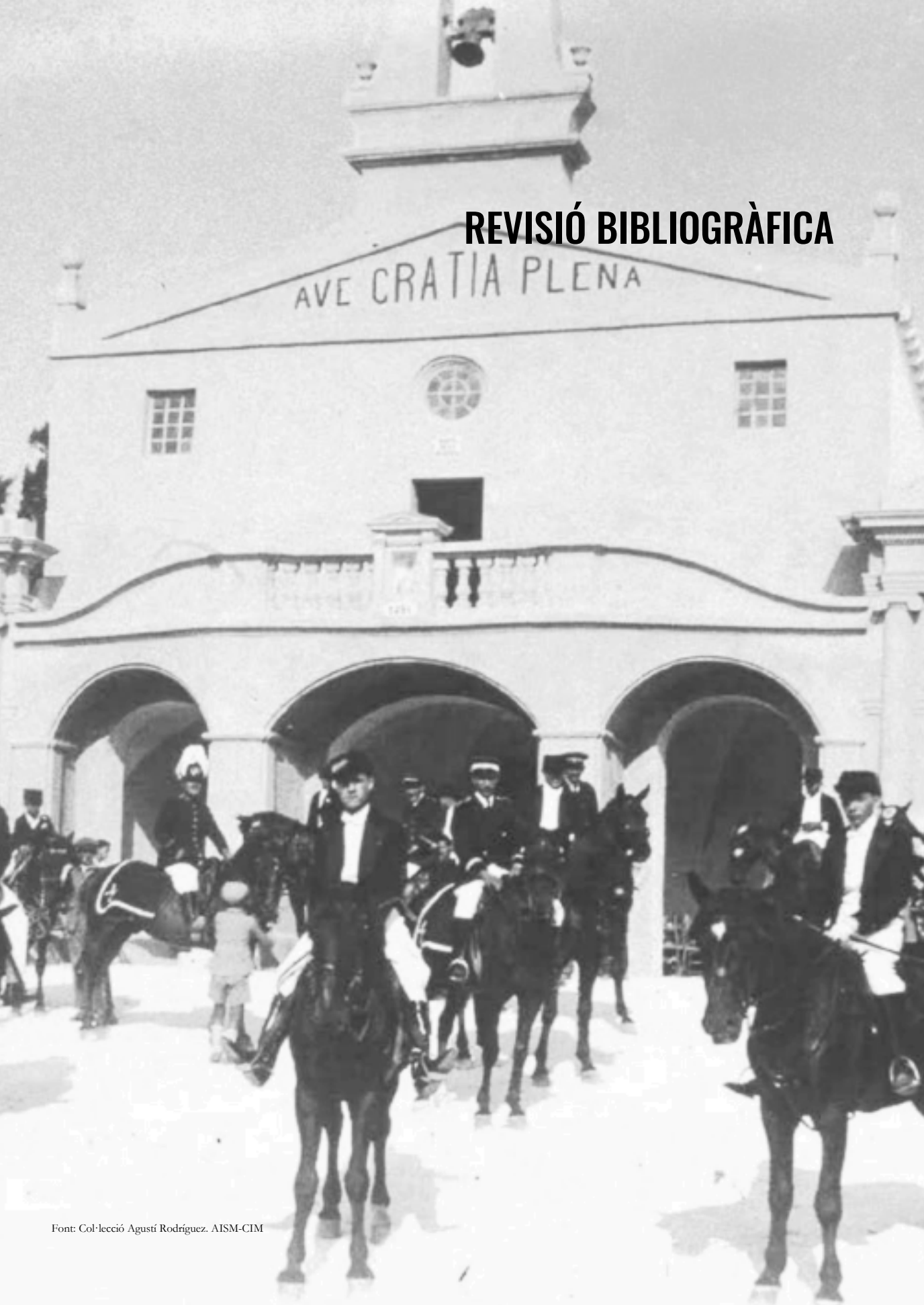
# BIBLIOGRAFÍA

1. Hinchcliff, K.W.; Geor, R.J. *The horse as an athlete: a physiological overview*; First Edit.; Elsevier Ltd, 2008; ISBN 9780702028571.
2. Hausberger, M.; Roche, H.; Henry, S.; Visser, E.K. A review of the human–horse relationship. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008, 109, 1–24, doi:10.1016/j.applanim.2007.04.015.
3. Merckies, K.; Franzin, O. Enhanced Understanding of Horse–Human Interactions to Optimize Welfare. *Animals* 2021, 11, 1347, doi:10.3390/ani11051347.
4. Pons Alzina, J. Festes i jocs a cavall a Menorca. In *Llibre de Cavalleria de les Illes Balears*; Edicions de turisme cultural. Illes Balears: Palma de Mallorca, 2001; pp. 249–265 ISBN 84-95473-19-4.
5. Keeling, L.; Tunón, H.; Olmos Antillón, G.; Berg, C.; Jones, M.; Stuardo, L.; Swanson, J.; Wallenbeck, A.; Winckler, C.; Blokhuis, H. Animal Welfare and the United Nations Sustainable Development Goals. *Front. Vet. Sci.* 2019, 6, doi:10.3389/fvets.2019.00336.
6. C. De la Fuente, M.F.; Souto, A.; B. Caselli, C.; Schiel, N. People’s perception on animal welfare: why does it matter? *Ethnobiol. Conserv.* 2017, 1–7, doi:10.15451/ec2017-10-6.18-1-7.
7. Ferlazzo, A.; Cravana, C.; Fazio, E.; Medica, P. The different hormonal system during exercise stress coping in horses. *Vet. World* 2020, 13, 847–859, doi:10.14202/vetworld.2020.847-859.
8. König v. Borstel, U.; Visser, E.K.; Hall, C. Indicators of stress in equitation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 190, 43–56, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.018.
9. Bartolomé, E.; Cockram, M.S. Potential Effects of Stress on the Performance of Sport Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 40, 84–93, doi:10.1016/j.jevs.2016.01.016.
10. Fink, G. Stress: Concepts, Definition and History. In *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*; Elsevier, 2017; pp. 549–555 ISBN 9780080450469.
11. Le Moal, M. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32, doi:10.1016/j.psyneuen.2007.03.019.
12. Romero, L.M.; Butler, L.K. *Endocrinology of Stress*; 2007; Vol. 20;
13. Romero, L.M.; Wingfield, J.C. The Classic Stress Response. In *Tempests, Poxes, Predators, and People*; Oxford University Press, 2015; pp. 115–148.
14. Ralph, C.R.; Tilbrook, A.J. The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J. Anim. Sci.* 2016, 94, 457–470, doi:10.2527/jas.2015-9645.



15. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
16. Gormally, B.M.G.; Romero, L.M. What are you actually measuring? A review of techniques that integrate the stress response on distinct time-scales. *Funct. Ecol.* 2020, 34, 2030–2044, doi:10.1111/1365-2435.13648.
17. Daly, W.; Seegers, C.A.; Rubin, D.A.; Dobridge, J.D.; Hackney, A.C. Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2005, 93, 375–380, doi:10.1007/s00421-004-1223-1.
18. Sollberger, S.; Ehlert, U. How to use and interpret hormone ratios. *Psychoneuroendocrinology* 2016, 63, 385–397, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.031.
19. Whitham, J.C.; Bryant, J.L.; Miller, L.J. Beyond Glucocorticoids: Integrating Dehydroepiandrosterone (DHEA) into Animal Welfare Research. *Animals* 2020, 10, 1381, doi:10.3390/ani10081381.
20. Manteca, X. Valoración del bienestar animal. In *Bienestar Animal*; Multimédica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 63-78

# REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA





# LES FESTES PATRONALS DE MENORCA

Es coneixen com a festes patronals de Menorca el conjunt d'activitats lúdiques, religioses, esportives i tradicionals que se celebren al llarg de l'estiu a cada un dels pobles que conformen l'illa de Menorca [1]. Una de les activitats principals de les celebracions és la protagonitzada pels cavalls i els seus genets que participen en els actes protocol·laris i religiosos que les caracteritza. Els actes cavallerescos comencen els dies 23 i 24 de juny a Ciutadella amb la celebració de Sant Joan i acaben al setembre a Es Mercadal amb la celebració de Sant Nicolau. Entre mig d'aquestes dates es celebren la resta de festes patronals corresponents a cada un dels pobles de Menorca. Tot i les particularitats que tenen cada una de les celebracions, totes elles, en els últims anys, han patit un cert grau d'uniformització. Aquest fet ens permet identificar una sèrie d'elements comuns i que desenvoluparem al llarg d'aquest apartat.

## ORIGENS

Després del llarg període de dominació almohade sota el califat de Còrdova, Menorca va ser conquerida i annexada a la corona catalanoaragonesa el gener de 1287 [2]. La conquesta de Menorca per part de les tropes catalanoaragoneses va portar una transició cap a un model socioeconòmic i polític feudal. Posteriorment, el 1295 Menorca va ser incorporada a la corona del regne de Mallorca on Jaume II n'era el Rei. La pertinença a aquest nou sistema polític va suposar un canvi radical per la societat menorquina. És aquest fet que, possiblement, explica l'interès pels actes i jocs cavallerescos àmpliament estesos per Europa i que fins al moment eren "desconeguts" per la societat menorquina. L'agost de 1301 el rei Jaume II de Mallorca va atorgar a Menorca la Carta de poblament on s'indicava l'ordenament jurídicopolític i social de l'illa [2]. El mes de març d'aquell mateix any també es va concedir el Pariatge, un conveni entre les autoritats eclesiàstiques de l'illa i el poder reial que atorgava el dret a l'església de requisar una part dels productes cultivats pels pagesos [2]. Durant un llarg període de temps Menorca es va organitzar sociopolíticament en Universitats [3], actualment municipis. Íntimament relacionat era la divisió eclesiàstica que es va implementar a Menorca durant l'època i que va resultar en la construcció de set parròquies en les quals posteriorment es van consolidar els nuclis urbans de l'illa [3]. Aquesta estreta relació de poder entre l'església i el poder reial va romandre gairebé intacte fins a les revolucions liberals del S. XX [4]. Els treballadors d'ofici crearen els gremis, conjunts de treballadors d'un mateix ofici que s'ajuntaven per establir una sèrie de normes que regien la seva feina. En paral·lel, les universitats anomenaven les obreries, agrupacions de persones del poble, principalment membres dels gremis i representants dels diferents estaments socials de l'època, que eren les encarregades de gestionar,

en definitiva, les parròquies del poble [5]. És a partir d'aquest moment quan comença a aparèixer el mot caixer, vigent fins a l'actualitat, tot i que en el seu origen els caixers eren les persones encarregades de l'administració econòmica, benestar de la parròquia i també eren les encarregades d'anar recol·lectant diners, muntats en cavalls, per tot el poble, per invertir-los en el manteniment eclesiàstic i en les celebracions del seu patró. Posteriorment a la recol·lecció de diners s'iniciava una peregrinació fins a la parròquia per venerar el Patró i un cop oficial l'acte religiós s'oferia un refrigeri amb beguda i menjar pels assistents. És la conjunció de tots aquests factors, tot i no saber-se del cert a causa de la pèrdua de l'Arxiu de la Universitat General de Menorca durant el saqueig de l'armada turca el 1558 [6], que s'estableix com un dels possibles orígens de les celebracions actuals a Menorca. Un dels documents escrits més antics i dels quals es té constància és el nomenament de la junta de caixers de Sant Joan a Ciutadella el 5 de juliol de l'any 1611 [7] i que es troba a l'Arxiu Històric Municipal de Ciutadella (Llibre de Determinacions. Tom V. 1600-1614, Fol 363). Aquest document, a més, és la primera constància escrita del nomenament del caixer Fadrí. Tal com s'ha indicat abans, les festes patronals celebrades a cada poble durant tot l'estiu tenen una línia comuna basada en els fonaments originaris de les celebracions.

## **CAVALLS, CAIXERS I CAVALLERS**

### **CAVALLS**

Els cavalls són els protagonistes principals de les festes patronals de Menorca i la majoria dels cavalls que hi participen són cavalls de Pura Raça Menorquina (Imatge 2). En els últims anys també hi solen participar cavalls de races diferents [8]. L'evolució de la societat i els avenços tecnològics han fet que actualment la majoria dels cavalls que participen en les festes patronals siguin entrenats durant tot l'any per aquests actes a diferència del que passava antigament on els cavalls eren destinats a les feines del camp i ocasionalment s'utilitzaven per a la colcada [8]. Des de l'any 1988 la raça és promoguda per l'Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Raça Menorquina, creada per difondre i mantenir les característiques del cavall menorquí i reconeguda com a tal per la *Jefatura de Cria Caballar* del Ministeri de Defensa espanyol [9,10]. Actualment, el cavall de raça menorquina està classificat pel Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació del Govern d'Espanya com una raça autòctona en perill d'extinció. El cens actual supera els 3000 individus [9]. La majoria de cavalls de raça menorquina es troben principalment localitzats a l'illa de Menorca tot i que des de fa més de deu anys va començar la seva expansió pel territori peninsular i diferents països d'Europa [9].

Els cavalls de raça menorquina són considerats morfològicament exemplars eumètrics amb el perfil subconvexe o recte i mediolínis de conformació forta i resistent. Els mascles són menys estilitzats que les femelles, les quals tenen el coll més fi i allargat i la gropa més quadrada (Imatge 1). L'alçada a la creu mínima acceptada en els mascles és d'1,54 metres i 1,51 metres en les femelles. Són de capa negra uniforme amb totes les seves varietats. Són admeses petites marques blanques al cap (estel) i extremitats (principi de calçat i calçats baixos) amb criteris d'eliminació com a reproductors si són massa extenses. És una raça criada principalment per la participació en les festes patronals dels diferents pobles de Menorca on desenvolupen el seu paper sociocultural. Cal destacar, també, la seva utilització en espectacles per la qualitat dels moviments que realitza. A nivell mediambiental les eugues i els poltres es mantenen en un sistema semi extensiu que aprofita els recursos disponibles en el medi ajudant així al manteniment de l'ecosistema. Pel que fa als mascles, el sistema és d'establució continuada en la majoria dels casos [9,10].



**Imatge 1.** Cavall de Raça Menorquina. A la imatge esquerra s'observa una euga i a la dreta un semental. Font: Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació; Govern d'Espanya [9,10].

## CAIXERS I CAVALLERS

La junta de caixers és el nom que reben el conjunt de cavallers que s'encarreguen de presidir i dirigir els actes cavallerescos de les festes patronals i s'escull cada dos anys [1,11]. La junta de caixers està formada per set càrrecs diferents i que representen a la societat estamental originària del moment en què es van començar a celebrar les festes patronals. A excepció de Ciutadella, on el màxim representant de la Junta de Caixers és el Caixer Senyor (membre d'una de les diferents famílies nobles de Ciutadella [12]), a la resta de municipis ho és el caixer batle, membre de l'ajuntament (batle o regidor) i representant del poder civil. El caixer capellà o popularment conegut com a "capellana" representa el poder eclesíastic i normalment és el rector de la parròquia o un clergue de la Diòcesi proposat per ell mateix. El caixer casat o menestral representa els artesans i ha de ser casat. Dins la comitiva, va just abans de les autoritats. El caixer sobreposat o

fadrí té l'encàrrec de portar la bandera de les festes. Ell és el primer de la colcada després del fabioler. El caixer pagès és el representant de la pagesia i ha de ser un pagès del municipi i té la funció d'executar les decisions preses pel caixer batle. En alguns municipis existeix la figura dels caixers vocals, que en són dos, i que tenen la funció d'assistir al caixer casat. Finalment, trobem la figura del flabioler, que s'encarrega a toc de tambor i flabiol d'anunciar el pas de la colcada. Aquesta figura és la única que no munta a cavall sinó que ho fa a llocs d'un ruc o somera com es coneix popularment a Menorca. En alguns municipis el fabioler no forma part de la junta de caixers. La resta de participants en la colcada reben el nom de cavallers.

## ELS ACTES

A la majoria de pobles les festes venen regides per una sèrie de normes i explicacions que es coneixen com a protocols [1]. Antigament, i com en molts altres aspectes, aquests es transmetien per la tradició oral entre les generacions de participants en la colcada. Per exemple, per les festes de Sant Joan (Ciutadella) es coneix que el 1843 Gabriel de Olivar Martorell va encarregar a una comissió l'elaboració i redacció dels protocols de la festa, però aquests no es van arribar a contemplar mai [13]. Pel que fa a Maó el 1985, la festa es va començar a regir pels primers protocols de les festes de la Mare de Déu de Gràcia escrits i oficialment aprovats, els quals s'han modificat al llarg dels anys fins a arribar a tenir l'última versió aprovada en l'última dècada [11].

Els actes que es realitzen a les festes patronals segueixen un patró similar a totes les celebracions i es realitzen durant dos dies consecutius. Per exemple a Maó [11], a l'hora indicada el flabioler, amb el primer toc de flabiol, sol·licita permís al caixer batle per iniciar el replec<sup>1</sup>. Va a buscar, primer de tot, el caixer fadrí i tornen a l'Ajuntament, on es fa l'entrega de la bandera i s'hi afegeix la Junta de Caixers, menys la capellana i el caixer batle, per començar el replec de la resta dels integrants. Seguidament, la colcada (Imatge 2) recorre els carrers i places de la població, d'acord amb l'itinerari que prèviament han marcat conjuntament l'Ajuntament i la Junta de Caixers. A l'hora convinguda, la colcada es dirigeix a l'església, per participar en la celebració de les completes<sup>2</sup>. Acabades les completes, els caixers i cavallers celebren la beguda<sup>3</sup>. En acabar aquesta, caixers i cavallers es dirigeixen cap a la celebració de l'acte més popular de les festes patronals i que es coneix com a

---

<sup>1</sup> Acció iniciada pel fabioler, que fa un itinerari amb la finalitat de reunir tots els membres de la colcada (Terminologia de les festes de Menorca, Consell Insular de Menorca).

<sup>2</sup> Ofici diví celebrat la vigília de la festa a l'ermita erigida en honor del patró (Terminologia de les festes de Menorca, Consell Insular de Menorca).

<sup>3</sup> Recepció que té lloc a cada jornada de les festes, a l'església o a les cases consistorials del municipi, per agrair als caixers i als cavallers la seva participació en la colcada (Terminologia de les festes de Menorca, Consell Insular de Menorca).

“jaleo”. Els caixers i cavallers entren a la plaça principal en grups reduïts o en parelles i fan botar els cavalls al compàs de la música.

En total es realitzen tres voltes<sup>4</sup>. L’endemà, o com es coneix popularment el dia de la festa, al matí es repeteix el cerimonial explicat anteriorment. En aquest cas, però, no es celebren les completes sinó que es celebra la missa de caixers i cavallers. Un cop acabada la missa comença de nou el jaleo a la mateixa plaça que el dia anterior, amb una diferència principal i és que la tercera volta es coneix popularment com volta de les canyes, on les autoritats fan entrega als participants d’una canya verda amb una cullera de plata. Un cop acabada la volta de les canyes, els caixers i cavallers s’acomiaten de les autoritats i la junta de caixers i es dirigeixen cap a la beguda. En alguns pobles, com és per exemple a Maó, després d’aquests actes es realitzen les populars corregudes<sup>5</sup>. Després d’això es celebra el darrer toc de flabiol que clou la festa fins l’any vinent.



**Imatge 2.** Colcada de les festes de la Mare de Déu de Gràcia a Maó (2018). A la imatge es pot veure el Flabioler i la Caixera Fadrina, darrere d’ells s’observa a la resta de caixers i cavallers. Font: Carlos Orfila.

---

<sup>4</sup> Cada una de les passades que fa la colcada per la plaça durant el jaleo (Terminologia de les festes de Menorca, Consell Insular de Menorca).

<sup>5</sup> Carreres de cavalls realitzades al cos del poble (Terminologia de les festes de Menorca, Consell Insular de Menorca).



## DEFINICIÓ

Malgrat la freqüència amb què s'utilitza el terme estrès en el llenguatge quotidià, és sorprenentment difícil de definir i per aquest motiu són nombroses les definicions que podem trobar a la literatura (e.g.: [14–18]). Els fonaments de l'estudi de l'estrès, i per tant de la definició del terme, els trobem a les contribucions dels doctors Claude Bernard [19], Walter B. Cannon [20], i Hans Selye [21] a partir dels anys vint del segle passat. Hans Selye, considerat el pare modern de l'estudi de l'estrès, va definir el terme com "la resposta inespecífica del cos a qualsevol demanda de canvi". Després de gairebé un segle de les que poden ser considerades les primeres aportacions modernes a la ciència de l'estrès, el terme encara és discutit per la comunitat científica [22], i una de les principals causes d'aquesta controvèrsia és la seva dimensió multidisciplinària [23], així com la implicació subjectiva i emocional que comporta la seva definició [24]. Malgrat això, existeix un cert consens amb el que es considera el sistema d'estrès i que inclou almenys tres elements comuns: **(1)** l'estressor, **(2)** el sistema d'integració de l'estressor i **(3)** la resposta d'estrès. Per la present tesi doctoral definirem l'estrès com la resposta fisiològica adaptativa que un organisme genera en front un estressor, real o interpretat, que percep com una amenaça per la seva integritat.

## ESTRESSOR

A la literatura sovint podem identificar un ús anàleg dels termes estímul estressant i estressor. No obstant això, un estímul estressant és qualsevol estímul que potencialment pot esdevenir estressor. Pel que fa als estressors són estímuls estressants que inicien una sèrie d'esdeveniments que desencadenen la resposta d'estrès [25]. S'han fet diversos estudis per tractar d'identificar quins estímuls són o no un estressor i suposen una implicació real per l'animal [26]. Així mateix, la percepció de l'estressor està relacionada amb la percepció individual i és el sistema nerviós central (SNC) el que atorga a un estímul estressant l'estatus d'estressor, que pot ser físic, fisiològic, psicològic o una combinació dels mateixos [16,18,27–29]. És important destacar que la intensitat de l'estímul estressant no és tan important com la percepció de l'amenaça per part del propi individu i que tal com hem indicat abans ve determinada per factors individuals com l'edat, el sexe, el temperament o les experiències passades [16].

## SISTEMA D'INTEGRACIÓ

L'estatus que un estímul estressant esdevingui en un estressor es produeix al SNC [30] amb la implicació de nombroses estructures encefàliques amb funcions sensorials, motores,

autonòmiques, cognitives i emocionals, i que varien en funció de la natura de l'estímul estressant [24,31]. Per una banda, els estressors físics activen principalment estructures relacionades amb el control de les funcions vitals localitzades en el tronc cerebral i l'hipotàlem. Les regions prosencefàliques també participen en la integració dels estressors físics així com l'àrea prelímbica, l'escorça prefrontal i el nucli central de l'amígdala. Per altra banda, els estressors de tipus psicològic es perceben en una condició anticipatòria que depèn, majoritàriament, de les estructures límbiques, mentre que el còrtex prefrontal és fonamental per a desenvolupar respostes adequades als canvis d'entorn [29,30]. Una altra estructura que destaca per la seva importància en la funció cognitiva i que s'activa amb la integració d'estressors tant físics com psicològics és l'hipocamp [29,30].

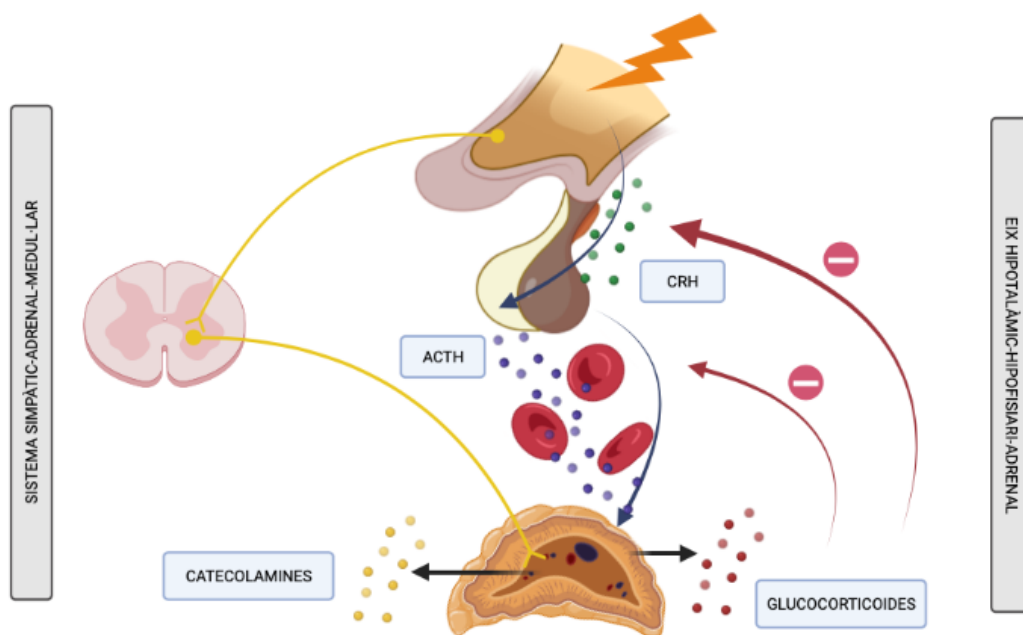
## RESPOSTA

La resposta d'estrès involucra a cinc components principals relacionats amb el sistema neuroendocrí, la conducta i el sistema immune [25,32]. En aquest apartat ens centrarem especialment en el sistema neuroendocrí i que és el sistema que s'activa més ràpidament amb la percepció d'un estressor [32–34]. Tot i que són moltes les hormones que han estat identificades com a part de la resposta d'estrès dels organismes vertebrats, tradicionalment s'ha considerat que dues tipologies hormonals formen els components centrals de la resposta neuroendocrina [27,32]. Aquestes són les catecolamines (adrenalina i noradrenalina) secretades per l'activació del sistema simpàtic-adrenal-medul·lar (SAM), i els glucocorticoides (cortisol i corticosterona), secretats per l'activació de l'eix hipotalàmic-hipofisiari-adrenal (HHA).

Amb la percepció d'un estressor la primera resposta que es desencadena es produeix per l'activació del sistema SAM [30,32]. El procés d'activació del sistema clou amb l'alliberament de catecolamines al torrent circulatori, prèviament sintetitzades i emmagatzemades en vesícules secretores a la medul·la adrenal i les terminacions nervioses del sistema nerviós simpàtic [32]. Aquest procés va ser descrit inicialment per Walter B. Cannon al seu llibre *"Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement"* [35], i és popularment conegut com la resposta de lluita o fugida (*Fight-or-Flight response*, en anglès). L'exemple més evident de l'activació d'aquesta resposta és la que per exemple es produeix quan una presa és atacada per un predador [34]. Els efectes principals a l'organisme que es produeixen amb l'alliberament d'aquestes hormones al torrent circulatori es resumeixen en l'increment del to simpàtic [24]. En altres paraules, l'alliberament de catecolamines al torrent circulatori disminueix l'activitat visceral, interromp la digestió, incrementa l'agudesia visual, augmenta el flux sanguini cerebral, incrementa l'eficàcia en l'intercanvi de gasos, activa la gluconeogènesi, incrementa la

vasodilatació muscular i disminueix la perifèrica, augmenta la freqüència cardíaca i provoca la piloerecció, entre d'altres [32,34].

D'altra banda, la resposta mediada per l'eix HHA s'inicia, igual que l'activació del sistema SAM, amb la percepció d'un estressor [34]. Aquesta resposta és menys ràpida que la generada per l'alliberament de catecolamines i és sostinguda en el temps mentre dura la potencial amenaça [32]. Un cop s'ha processat l'estímul com estressor, les neurones del nucli paraventricular de l'hipotàlem secreten al sistema portal hipofisiari quantitats variables d'hormona alliberadora de corticotropina (CRH), entre d'altres, i estimula a les cèl·lules corticotropes de la hipòfisi anterior provocant l'alliberació d'hormona adrenocorticotròpica (ACTH). La presència d'aquesta hormona en el torrent sanguini estimula, finalment, l'alliberament de glucocorticoides per part de l'escorça adrenal, les concentracions dels quals s'autoregulen amb un feedback negatiu sobre la secreció de CRH i ACTH [33,34,36]. Els glucocorticoides biològicament més importants en els mamífers són el cortisol i la corticosterona [36]. Aquests actuen en processos catabòlics associats a la mobilització de les reserves energètiques, estimulen la gluconeogènesi, afecten el metabolisme proteic i lipídic i suprimeixen les respostes immunitàries temporals no desitjades, entre d'altres [25,32].



**Imatge 3.** Representació esquemàtica dels principals components i hormones alliberades amb l'activació de sistema simpàtic-adrenal-medul·lar i l'eix hipotalàmic-hipofisiari-adrenal.

## **HORMONES ESTEROIDALS COM A INDICADORS FISIOLÒGICS DE LA RESPOSTA D'ESTRÈS**

Tal com hem indicat abans, l'avaluació de l'estrès no es pot realitzar mitjançant la identificació d'un presumpte estressor i el coneixement i avaluació dels processos cognitius i sentiments relacionats amb l'estrès en animals està, encara, molt poc desenvolupat [37]. Així doncs, la valoració de l'estrès en animals s'ha realitzat, gairebé sempre, mitjançant la identificació de la seva resposta utilitzant indicadors. No obstant, la resposta d'estrès inclou una varietat de particularitats i característiques que poden variar notòriament entre espècies, entre individus, o en funció de l'experiència o l'estat fisiològic del propi animal [38]. Desafortunadament no existeix un indicador d'estrès ideal, i per això el mètode més adequat per avaluar la resposta d'estrès dependrà, majoritàriament, del disseny experimental i de les característiques generals de la situació que es pretengui avaluar. Són diversos els paràmetres hematològics i endocrins (e.g.: [39–42]) que s'han utilitzat per estimar la resposta d'estrès però la quantificació d'hormones esteroidals i més específicament del cortisol ha sigut un dels paràmetres més utilitzats per valorar-la. Les concentracions hormonals s'han mesurat habitualment en sang [24,36,43], malgrat això, la utilització i validació d'altres matrius com la saliva, el pèl, les femtes o l'orina han esdevingut d'interès general en aquest camp de la recerca [43]. És senzill suposar que el desenvolupament i la recerca en la detecció hormonal en altres matrius està motivada per raons pràctiques. No obstant això, la influència de la matriu en la detecció hormonal va molt més enllà dels avantatges pràctics i és que en funció de la matriu que s'utilitzi la informació que s'obtindrà serà diferent en marc i durada. Així doncs, l'ús de diferents matrius multiplica les possibilitats i la versatilitat de la detecció hormonal pel monitoratge de la resposta d'estrès [43]. Tal com hem comentat anteriorment són nombrosos els paràmetres sanguinis i endocrins que s'han fet servir per estimar la resposta d'estrès però en aquest apartat ens centrarem principalment en caracteritzar l'ús del cortisol, la testosterona i la DHEA o el seu sulfat (DHEA-S) en sang, saliva i pèl, i que són l'objecte principal de la present tesi doctoral.

### **CORTISOL**

El cortisol és un regulador de la transcripció gènica i a causa d'aquest fet els efectes més immediats que provoca es poden començar a detectar entre 30 i 60 minuts després del seu alliberament [36]. Els efectes principals del cortisol es poden classificar en cinc grups principals tal com van establir Romero et al. [25,32,34]: **(1)** augment de les concentracions de glucosa en sang, **(2)** alteració del comportament, **(3)** inhibició del creixement, **(4)** inhibició de la reproducció i **(5)** modulació del

sistema immunitari. Si un estressor no continua, i per tant disminueix l'activitat de l'eix HHA, la retroalimentació negativa generalment comença a reduir les concentracions de glucocorticoides en un temps variable, tot i que com que les noves proteïnes poden continuar funcionant i els efectes fisiològics poden mantenir-se actius.

## **Sang i saliva**

Les concentracions de cortisol, tal com s'ha indicat abans, han sigut habitualment quantificades a la sang (sèrum o plasma). Després de la integració d'un estressor els nivells de cortisol sanguini tendeixen a incrementar entre els 3 i els 5 minuts posteriors, depenent de l'espècie [43,44]. Així doncs, amb la quantificació sèrica o plasmàtica s'obté una informació dels nivells de cortisol circulants en el moment de l'extracció [43]. Aquest fet caracteritza la utilització de la sang com a matriu adient per avaluar els increments aguts de cortisol. Paral·lelament a les determinacions en sang, trobem les determinacions en saliva, una matriu que ofereix una informació de l'activitat adrenal relativament similar a la sang i amb una sèrie d'avantatges pràctics que desenvoluparem al llarg d'aquest apartat [45,46].

La secreció de cortisol segueix un ritme de secreció circadiari regulat pel nucli supraquiasmàtic de l'hipotàlem [47,48]. En els cavalls, igual que en la majoria de mamífers diürns, s'obtenen les concentracions més elevades durant el matí, disminueixen progressivament durant el dia, i assolixen les concentracions més baixes durant la nit [49]. Aquest patró s'ha pogut mesurar satisfactòriament tant en sang com en saliva [50,51]. Canvis ambientals o d'estabulació, situacions estressants, un exercici intens així com diversos processos patològics s'han suggerit com potencials disruptors d'aquest patró [52–55]. Seguint aquesta línia també s'ha pogut determinar un ritme estacional en els patrons de secreció de cortisol malgrat que els resultats obtinguts difereixen notablement entre els diferents estudis (revisat a Murphy et al. [49]). És per aquest motiu que es recomana, en la mesura del possible, obtenir un seguit de mostres prèvies dels individus que participaran en l'estudi per tal d'obtenir una imatge dels seus nivells basals.

La major part del cortisol en sang es troba unit a proteïnes transportadores específiques anomenades CBG, sigles pel seu nom en anglès "*corticosteroid binding globulin*" [56]. La fracció lliure, i que és capaç de difondre als teixits, és la que té la funció biològica activa i que s'encarrega d'activar les diferents funcions biològiques [24]. La fracció lliure a banda d'actuar en els teixits diana també té la capacitat, per difusió passiva, de difondre pels capil·lars sanguinis i arribar a altres matrius com per exemple la saliva [45,57]. En conseqüència, la quantificació del cortisol en saliva ens estarà proporcionant informació de la part de cortisol biològicament actiu en l'animal [36]. El cortisol

que es troba unit a proteïnes en els cavalls oscil·la entre el 70 i el 80% [56,58]. Aproximadament només un 10% queda lliure i exerceix les seves funcions biològiques [56,58]. Aquestes proporcions es poden veure modificades per una sèrie de factors tant intrínsecs (e.g: edat, estat nutricional, genètica) com extrínsecs (e.g: estrès agut o crònic) a l'animal [59,60]. En situacions d'estrès la capacitat d'unió del cortisol a aquestes proteïnes es veu modificada i per tant la proporció de cortisol lliure i biològicament actiu s'incrementa [61].

La relació entre els nivells de cortisol en aquestes dues matrius s'ha estudiat àmpliament en humans (e.g.: [62]) i altres espècies incloent els cavalls [63–66]. Generalment l'exploració d'aquests tipus de relacions s'ha realitzat mitjançant l'estimulació de l'eix HHA amb ACTH exògena. Peeters et al. [64] van descriure que existia una forta relació entre el cortisol salival i el cortisol sanguini, suggerint que les variacions en les concentracions de cortisol sanguini podien explicar en un 80% les variacions en les concentracions de cortisol salival i viceversa. A més també va determinar una elevada correlació ( $r = 0.9$ ) entre les dues matrius. Aquest fet ens indica com en els èquids les variacions de cortisol en saliva reflecteixen les variacions de cortisol en sang. Malgrat els resultats exposats anteriorment, s'han observat diferents graus de correlació en funció de l'estressor al qual ha sigut exposat l'animal. Per exemple, Kedzierski et al. [65] van determinar que les concentracions de cortisol salival preses 20 minuts després d'un exercici d'intensitat elevada mostraven una correlació positiva i significativa ( $r = 0,67$ ) amb les mostres de sang obtingudes just al finalitzar l'activitat, o Bohák et al. [50] van observar com les concentracions de cortisol salival presentaven una baixa correlació ( $r = 0.3$ ) amb els nivells de cortisol plasmàtic lliure en condicions basals i sense una estimulació aparent de l'eix HHA. A pesar de les diferències observades podem concloure que les concentracions de cortisol salival són un reflex de les concentracions de cortisol sanguini. Les variacions de cortisol en saliva i sang s'han utilitzat com a indicador a la resposta d'estrès en nombrosos estudis en cavalls. En resum, s'han fet servir per avaluar la resposta d'estrès agut en diferents tipus de disciplines com la doma (e.g.: [67,68]), el salt (e.g.: [68,69]), les curses (e.g.: [65,70]) o les curses de resistència (e.g.: [71–73]), així com també per determinar els efectes del transport (e.g.: [74,75]), sistemes de maneig (e.g.: [55,76]) o els inicis en l'entrenament en cavalls joves (e.g.: [77]).

## **Pèl**

El pèl es considera una matriu acumulativa per la seva capacitat d'incorporar hormones i altres compostos durant la seva fase de creixement. D'aquesta manera, és possible obtenir informació de l'activitat endocrina de forma retrospectiva i que pot variar de setmanes a mesos [43]. Així doncs, el pèl seria una matriu ideal per monitorar, entre d'altres, processos d'estrès crònic [78,79].

Els mecanismes d'incorporació de compostos com per exemple les hormones esteroidals al pèl segueixen sense estar plenament determinats. Així i tot, la hipòtesi més acceptada determina que la incorporació hormonal es produeix durant la fase de creixement del pèl a través de mecanismes de difusió passiva. La major part de l'hormona que s'incorpora al pèl és hormona circulant i en menor mesura hormona present a la suor o al greix dèrmic [79,80].

El mostreig del pèl es considera un procediment o mínimament o no invasiu i el mètode més aconsellable per aconseguir la mostra en qüestió és el mètode conegut en anglès com “*shave and reshave*”. Aquest mètode consisteix a afaitar una porció determinada de l'animal i tornar-la a afaitar transcorregut el temps d'interès [78,81]. D'aquesta manera, quan s'analitzen les concentracions hormonals s'obté, a priori, un valor relatiu a la quantitat hormonal que ha estat en circulació i que ha difós al pèl durant el període que s'ha determinat, juntament amb la resta de factors que poden ser una aportació de cortisol a la matriu [82,83]. Tot i ser un mètode no invasiu és només un procediment apte per aquells animals que es deixin manipular correctament.

La quantificació del cortisol en pèl està subjecte a una sèrie de factors influents que poden provocar una potencial font de variació en les concentracions hormonals i que per tant han de ser considerats per no incórrer en una interpretació incorrecta dels resultats [78,81]. En funció de la classificació establerta per Heimbürge et al. [78] els factors influents de les concentracions de cortisol en pèl es poden classificar en: **(1)** característiques específiques del pèl (e.g. la regió del cos [84], la fase de creixement [81] o el color [82,85]), **(2)** característiques intrínseques de l'animal (e.g. l'edat [85,86], el sexe [87] o l'estat reproductiu [88,89]), i finalment, **(3)** factors externs, com per exemple, l'estació de l'any [90,91].

Són diversos els estudis en cavalls que han utilitzat les concentracions de cortisol en pèl com a mesura retrospectiva de l'activitat de l'eix HHA i per tant com a mesura retrospectiva de la resposta d'estrès. Per les característiques pròpies de la matriu, i que han sigut exposades al llarg d'aquest apartat, els estudis realitzats en cavalls s'han centrat a identificar l'impacte de situacions que poden provocar un estrès crònic a l'animal com per exemple els sistemes d'estabulació o maneig [91–94], o processos patològics [84,90]. Una altra aproximació ha sigut utilitzar les concentracions de cortisol en pèl en poltres com una mesura de la quantitat de cortisol circulant al fetus i de la relació maternofetal durant l'últim terç de gestació obtenint una informació que no seria possible obtenir amb altres tipus de mostres [86,95].

## TESTOSTERONA I DHEA

Els múltiples efectes que produeixen els glucocorticoides a l'organisme han incentivat l'estudi de les relacions amb altres sistemes endocrins i altres hormones [96,97]. Un exemple d'aquestes vinculacions és la relació que s'estableix entre l'eix HHA i l'eix hipotàlem-hipofisiari-gonadal (HHG). L'eix HHG és el principal regulador de la funció reproductiva dels mamífers i la mesura de la seva activitat així com la relació amb l'eix HHA han estat utilitzades com a mesura de la resposta a l'estrès en diverses situacions [98–101]. El cortisol actua, en primer lloc, a nivell de l'hipotàlem per a disminuir la síntesi i la secreció d' Hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) i, en segon lloc, a nivell de la hipòfisi per a reduir la capacitat de resposta d'aquesta a la GnRH i modular la secreció de gonadotrofines a través d'una sèrie de mecanismes [99,102]. Així doncs, una situació d'estrès perllongada en el temps, podria afectar negativament la producció d'esteroides sexuals com és el cas de la testosterona [102]. La testosterona, individualment, s'ha utilitzat com a indicador fisiològic d'estrès, principalment, pel seu impacte en el rendiment reproductiu [99,102], la taxa de creixement, la modulació del sistema immune, i el seu paper clau en l'exercici a causa de la seva funció anabòlica i en el rendiment muscular [103], entre d'altres. Un altre tipus d'aproximació a l'estudi de la resposta d'estrès és la valoració dels antagonistes dels glucocorticoides com per exemple la dehidroepiandrosterona (DHEA) o el seu sulfat (DHEA-S) [96,104]. Aquesta hormona és un esteroide derivat del colesterol i que es produeix principalment en la zona reticulada i en la zona fasciculada de l'escorça adrenal [105]. La DHEA és alliberada per l'activació de l'eix HHA i es considera un indicador de resiliència a l'estrès a causa de les seves funcions d'antienvelliment, neuroprotecció i de millora de la immunitat [104,105].

Tradicionalment les determinacions de testosterona s'han realitzat en sang [106–110]. No obstant això, alguns estudis realitzats recentment han explorat la utilització d'altres matrius com la saliva i el pèl [111,112]. La secreció de testosterona té un fort component sexual i en mascles sencers s'ha pogut determinar un patró de secreció circadiari i circannual en sang, a diferència del que s'ha observat en femelles o mascles sanats [111,113,114]. Aquest patró, però, no s'ha pogut determinar en saliva possiblement, i a diferència del que veiem en cortisol, pel baix grau de correlació observat entre la testosterona plasmàtica i salival [111]. Negretti et al. [112] van realitzar la determinació de testosterona en pèl i sèrum per determinar les relacions de dominància entre diferents sementals salvatges obtenint una absència de correlació entre ambdues matrius. Aquest fet es deu, possiblement, a la informació que proporcionen cada una d'aquestes matrius.

Altres estudis han caracteritzat les variacions de testosterona resultants de la realització d'exercicis en diverses disciplines eqüestres. Baker et al. [115] van observar que les concentracions



plasmàtiques de testosterona eren significativament menors en cavalls de curses que en cavalls destinats per activitats recreatives, o Golland et al. [116] van determinar com les concentracions de testosterona incrementaven significativament després d'un exercici extrem i continuaven alterades entre les 26-32 hores posteriors a la realització de l'activitat. Per altra banda, també s'han documentat increments de les concentracions de testosterona plasmàtica en diferents processos patològics aguts com la laminitis, els còlics, o la sèpsia en poltres nounats, i crònics com processos degeneratius articulars [117,118]. Aquestes troballes posen de manifest que la caracterització biològica i la implicació d'aquesta hormona en la resposta d'estrès en èquids requereix investigar-se més detingudament per poder arribar a ser emprada com un marcador de la resposta d'estrès.

La utilització de la DHEA com a indicador fisiològic d'estrès s'ha utilitzat àmpliament en multitud d'espècies (revisat a Whitham et al. [104]). Tot i això, en cavalls, a diferència del cortisol i la testosterona, el seu ús ha sigut molt menys explorat. Tal i com hem vist fins ara amb la resta d'hormones, les determinacions plasmàtiques de DHEA s'han utilitzat com a indicador d'estrès en processos patològics aguts [117,118] o els efectes de diferents tipus d'estabulació [94]. Fins on saben els autors, no es coneix cap publicació que quantifiqui la DHEA o el seu sulfat en saliva de cavalls. Finalment els estudis realitzats en pèl s'han basat en avaluar diferents tipus d'estabulació i maneig [94,119]. Recentment, un altre estudi ha utilitzat la quantificació de DHEA en pèl de poltres com un indicador retrospectiu de l'època prenatal [95], suggerint els increments de la DHEA en els poltres com un indicador d'estrès durant l'últim terç de la gestació.

## **MÈTODES DE DETECCIÓ I VALIDACIÓ D'HORMONES ESTEROIDALS**

### **MÈTODES DE DETECCIÓ**

En les últimes dècades s'han desenvolupat i perfeccionat nombroses tècniques per la detecció hormonal [120–122] com l'espectrofotometria de masses, la cromatografia líquida o la quimioluminescència [123,124]. En aquest apartat ens centrarem a caracteritzar els immunoassaigs, i especialment els immunoassaigs enzimàtics que són el mètode més utilitzat en la present tesi doctoral.

Els immunoassaigs es defineixen com les reaccions d'unions quantitatives entre els anticossos i els antigens diana [122]. Aquesta tècnica s'ha convertit en l'eina més valuosa dels diagnòstics *in vitro* i es fan servir de manera habitual per la detecció d'una àmplia gama de compostos en els quals s'hi inclouen les hormones [125]. La primera tècnica immunoenzimàtica que es va desenvolupar van ser els radioimmunoassaigs [120], tècnica desenvolupada a finals dels anys cinquanta pels guardonats amb el premi Nobel Yalow i Berson per detectar la insulina [126]. Yalow i Berson van

combinar per primera vegada l'alta sensibilitat d'un compost radioactiu amb l'alta especificitat d'una reacció immunològica mitjançant la formació d'un complex antigen-anticòs termodinàmicament estable. Malgrat això, aquest mètode presenta alguns desavantatges relacionats principalment amb l'ús de la radioactivitat [120]. Anys més tard i motivats pels problemes que comportava el treball amb compostos radioactius, es van desenvolupar els immunoassaigs no isotòpics [120]. Els més rellevants van ser els immunoassaigs enzimàtics que des dels anys vuitanta han sigut els més utilitzats. Els immunoassaigs enzimàtics es basen en la utilització d'anticossos i antigens marcats amb enzims per detectar les molècules d'interès [125]. La tècnica utilitza el concepte bàsic de la immunologia que es basa en la unió específica antigen-anticòs. Els antigens o anticossos de la mostra s'immobilitzen sobre un suport sòlid. Posteriorment s'afegeix un anticòs o antigen específic addicional sobre la superfície i es produeix la interacció antigen-anticòs. Aquest anticòs o antigen addicional està unit a un enzim que per si sol pot ser detectat per un anticòs secundari vinculat a un enzim [125]. En l'etapa final, s'afegeix una substància que conté el substrat de l'enzim. Això donarà lloc a una reacció amb un senyal detectable, com per exemple un canvi de color. L'alta especificitat, el "baix" cost econòmic i la no utilització de compostos radioactius, han fet que els immunoassaigs enzimàtics siguin més populars que les altres tècniques prèviament esmentades [125].

## **VALIDACIÓ DE L'ASSAIG**

Qualsevol tècnica utilitzada per monitorar els nivells hormonals requereix d'una validació prèvia abans de ser utilitzada, i especialment quan s'utilitza en matrius alternatives a la sang per avaluar la resposta d'estrès [127]. Això és especialment important perquè el rendiment i validesa de qualsevol tècnica influirà en una interpretació correcta dels resultats [128]. Així doncs, el pas previ a la quantificació hormonal implica la selecció i validació de les tècniques adequades [127,129].

Generalment, la majoria de kits comercials d'immunoassaigs enzimàtics ja venen validats, no obstant moltes vegades aquests kits no són específics d'espècie i requereixen d'una validació bioquímica exhaustiva per la matriu i espècie d'interès [127,130]. La validació bioquímica de l'assaig segueix els criteris d'una validació immunològica basada en la determinació de l'especificitat, exactitud, precisió, i sensibilitat de l'assaig. L'especificitat es refereix a la capacitat del kit en quantificar el compost que realment volem mesurar i no altres compostos presents a la mostra i que puguin ser considerats "falsament" com el nostre compost d'interès. En altres paraules, l'especificitat determina que el nostre kit no pateix reaccions creuades significants amb altres compostos que no són del nostre interès. L'exactitud mesura com d'exacte és l'assaig mitjançant la mesura de la correlació entre els valors teòrics i els reals per un seguit de mostres determinades.

Per altra banda, la precisió del kit ve determinada per la repetibilitat i és la mesura de la variació de determinacions repetides de la mateixa mostra tant en el mateix assaig com en assaigs diferents. Finalment la sensibilitat del kit es refereix a la capacitat per distingir i mesurar la menor concentració de l'hormona d'interès [36,127,128,131–134].

## BENESTAR ANIMAL

### DEFINICIÓ

El benestar animal és un terme multidisciplinari que implica la ciència, ètica, economia i política [135,136]. A causa de la seva condició, el concepte de benestar no resulta fàcil de definir i per tant s'ha definit de múltiples formes. Una de les definicions més citades a la literatura és la proposada pel Dr. Donald Broom [137] i que defineix el concepte de benestar animal com “l'estat en què es troba un individu en relació amb els seus intents d'afrontar l'ambient”. Seguint amb l'intent de definir el concepte de benestar animal, en general, es poden identificar tres grans grups de definició: **(1)** definicions basades en la salut, **(2)** definicions basades en el balanç entre les emocions negatives i positives que experimenta un animal, i **(3)** definicions basades en el fet que un animal pugui mostrar el seu comportament “natural”. Els tres grups de definició contenen trets que poden ser útils i rellevants, però per si soles resulten insuficients. Així doncs, una definició completa del terme de benestar animal hauria d'incloure la conjunció dels tres factors exposats anteriorment: salut, emocions i comportament [138].

L'any 1965 va ser un any clau per la ciència del benestar animal amb la proposició del principi de les cinc llibertats per part del comitè Brambell del Regne Unit [139]. Posteriorment, el 1992, es va presentar una modificació del denominat principi de les cinc llibertats i que s'ha utilitzat fins a gairebé avui en dia [140]. El principi de les cinc llibertats reflecteix la natura multidimensional i disciplinar del concepte de benestar i constitueix una guia per identificar possibles problemes relacionats amb el mateix. La revisió dels principis de les cinc llibertats de 1992 establia els cinc principis com: **(1)** absència de set, fam i malnutrició, **(2)** absència d'incomoditat física i tèrmica, **(3)** absència de dolor, lesions i malaltia, **(4)** possibilitat d'expressió de comportaments normals i **(5)** absència de por i distrès. Malgrat tot, aquest model presenta una sèrie de limitacions que amb el pas del temps s'han intentat esmenar fins a arribar a obtenir, avui en dia, el conegut com a model dels cinc dominis. Una primera limitació és que principalment els principis es referien a l'absència d'elements negatius sense contemplar la presència d'elements positius a excepció del quart principi on es contemplava l'expressió de les conductes normals per un animal. Per altra banda, un altra limitació és que alguna de les “absències” no són completament no desitjables i es

superposen entre elles, el que pot suposar un problema quan s'utilitzen per realitzar protocols de benestar animal [138,141].

Per resoldre aquestes limitacions, el 1994 el Dr. David J. Mellor va presentar el model dels cinc dominis [142] i que ha estat en constant revisió fins a la seva última versió publicada l'any 2020 [143]. Els dominis del model més actualitzat es basen en **(1) Nutrició, (2) Entorn físic, (3) Salut, (4) Interaccions conductuals, (5) Estat mental**. Els quatre primers dominis es centren en els factors que donen lloc a experiències subjectives específiques ja siguin positives o negatives que contribueixen en l'estat mental de l'animal i que resulten en el cinquè domini. Dit d'altra manera, el benestar animal resulta de l'equilibri entre les emocions positives i negatives que un individu experimenta en un temps determinat i que són generades pels quatre primers dominis [144]. Si bé és cert que el cinquè domini és el que s'utilitza en última instància per determinar el benestar d'un animal en funció d'aquest model, resulta de difícil mesura, pel que a la pràctica s'utilitzen els quatre primers dominis per realitzar una mesura objectiva del benestar d'un animal [144].

Així doncs, una possible definició completa de benestar animal, i la que es considerarà per la present tesi doctoral, seria que és una característica individual i variable (de molt satisfactori a molt deficient) en un període de temps determinat que pot mesurar-se de forma objectiva i indirecta mitjançant indicadors avaluant la nutrició, l'entorn, la salut, les interaccions conductuals i l'estat mental de l'individu i que no només ha de considerar els factors que contribueixen a reduir-lo sinó que també ha de considerar els factors que contribueixen a augmentar-lo.

## **VALORACIÓ DEL BENESTAR ANIMAL**

De la mateixa manera que ho era la definició, la valoració del benestar animal també representa un repte. El benestar animal no es pot mesurar directament, i per tant requereix d'eines que permetin la seva valoració de forma objectiva i repetible. Aquestes eines són, principalment, els indicadors i els protocols de benestar, els quals permeten de forma objectiva i repetible, obtenir informació del nivell de benestar d'un animal en un moment determinat [141,144].

Els indicadors de benestar animal han de tenir una sèrie de característiques per ser útils en la seva utilització[145]. Aquestes es poden resumir en què un indicador ha de ser vàlid, robust, pràctic i amb una bona correlació entre observadors i el propi observador [144]. Per aquest motiu, i amb les limitacions dels indicadors, no n'existeix cap que sigui suficient per valorar el benestar animal per sí mateix. Els indicadors de benestar animal es poden dividir en dos grans grups principals [146]: **(1) els basats en l'animal i (2) els basats en l'ambient**. Els indicadors basats en l'animal són tots aquells indicadors que es mesuren directament en l'animal, i que per tant, et donen informació

directa del seu estat. Aquests indicadors es poden classificar en 4 grups que corresponen a: **(1)** condició corporal i postura, **(2)** mortalitat malalties i lesions, **(3)** observacions conductuals, i **(4)** indicadors fisiològics. Per altra banda els indicadors basats en l'ambient són aquelles variables que no es mesuren en l'animal sinó que es mesuren en l'entorn on es troben (e.g.: instal·lacions, condicions ambientals, sistemes de maneig, entre d'altres). Una de les principals limitacions dels indicadors ambientals és la variabilitat en l'efecte que poden tenir en un individu i que aquestes estan relacionades amb altres variables [141,144]. Per aquest motiu nombrosos autors consideren que el benestar animal hauria d'avaluar-se amb els indicadors basats en l'animal perquè són els que proporcionen informació directa del seu estat [144]. Tot i les presents limitacions, la mesura conjunta d'aquests dos grups d'indicadors (basats en l'animal i ambientals) és la que proporcionaria una imatge més completa de l'estat de benestar de l'animal.

Tal i com hem indicat abans, no existeix cap indicador que per si sol pugui ser utilitzat per valorar el benestar d'un animal. D'aquesta manera la conjunció de diversos indicadors es recull en el que s'anomenen protocols d'avaluació de benestar animal. Els protocols, a banda de tenir un conjunt d'indicadors, han de comptar amb una descripció de com s'han de valorar i/o mesurar [144]. El projecte *Welfare Quality*® finançat per la Unió Europea entre els anys 2004 i 2009 es va encarregar de l'elaboració de protocols d'avaluació de benestar animal per animals de granja, principalment, i són els protocols més utilitzats a nivell europeu. Aquests protocols han servit de punt de partida per l'elaboració de nous protocols en animals domèstics i de zoo (e.g.: [147–149]). Els protocols *Welfare Quality*® s'estructuren en tres nivells diferents [150]: **(1)** els principis, **(2)** els criteris, i **(3)** els indicadors. Per una banda, els principis es basen en els cinc dominis mesurables proposats per Mellor [143] i es divideixen en una bona alimentació, un bon allotjament, una bona salut i un comportament apropiat. Per cada un dels principis existeixen una sèrie de criteris i que varien en número (entre dos i quatre) en funció del principi. Finalment cada un dels criteris compta amb una sèrie d'indicadors que permeten la seva mesura i que són específics per cada una de les espècies i situacions a avaluar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cultura popular i d'arrel tradicional de Menorca. Les festes de Menorca. Available online: [http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page\\_id=592](http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page_id=592).
2. Casanovas i Camps, M.À. De Manurqa a Menorca. In Enciclopèdia de Menorca. X, Historia II: de la conquesta cristiana a la Guerra de Successió; Obra Cultural de Menorca: Maó, Illes Balears, 2000; pp. 3–29 ISBN 84-87864-07-4.
3. Casanovas i Camps, M.À. La crisi baixmedieval. In Enciclopèdia de Menorca. X, Historia II: de la conquesta cristiana a la Guerra de Successió; Obra Cultural de Menorca: Maó, Illes Balears, 2000; pp. 33–70 ISBN 84-87864-07-4.
4. Pons Alzina, J. Festes i jocs a cavall a Menorca. In Llibre de Cavalleria de les Illes Balears; Edicions de turisme cultural. Illes Balears: Palma de Mallorca, 2001; pp. 249–265 ISBN 84-95473-19-4.
5. Pons Alzina, J. L'obreria de Sant Joan dins el conjunt de les obrieres a Ciutadella devers 1687. D. Menorca 2019, 27.
6. Casanovas i Camps, M.À. De Ferran el catòlic a Felip IV: dinàmica dels esdeveniments. In Enciclopèdia de Menorca. X, Historia II: de la conquesta cristiana a la Guerra de Successió; Obra Cultural de Menorca: Maó, Illes Balears, 2000; pp. 177–214 ISBN 84-87864-07-4.
7. Cleofé Huguet, S. Coneix Sant Joan. Ciutadella de Menorca. Origen i història de les festes de Sant Joan. Available online: <http://coneixsantjoan.ajciutadella.org/Contingut.aspx?IdPub=8303> (accessed on Apr 5, 2022).
8. Cultura popular i darrel tradicional de Menorca. Les festes de Menorca. Els cavalls. Available online: [http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page\\_id=642](http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page_id=642) (accessed on Apr 4, 2022).
9. Sistema Nacional de Información de Razas. Raza equino caballar. Cavall menorquí. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razasganaderas/razas/catalogo-razas/equino-caballar/menorquina/default.aspx> (accessed on Apr 4, 2022).
10. Marquès, J. El cavall menorquí. In Llibre de Cavalleria de les Illes Balears; Edicions de turisme cultural. Illes Balears: Palma de Mallorca, 2001; pp. 73–88 ISBN 84-95473-19-4.
11. Protocols de les festes patronals del temre municipal de Maó. Available online: [https://ajmao.org/WebEditor/Pagines/file/cultura/protocols\\_festes\\_de\\_gràcia\\_definitius\\_i\\_corregits\\_3.pdf](https://ajmao.org/WebEditor/Pagines/file/cultura/protocols_festes_de_gràcia_definitius_i_corregits_3.pdf).
12. Cultura popular i darrel tradicional de Menorca. Les festes de Menorca. La junta de caixers. Available online: [http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page\\_id=606](http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page_id=606).

13. Cultura popular i d'arrel tradicional de menorca. Les festes de Menorca. Els protocols. Available online: [http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page\\_id=613](http://culturapopularmenorca.cat/continguts/?page_id=613) (accessed on Apr 5, 2022).
14. Romero, L.M.; Dickens, M.J.; Cyr, N.E. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm. Behav.* 2009, 55, 375–389, doi:10.1016/j.yhbeh.2008.12.009.
15. Le Moal, M. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32, doi:10.1016/j.psyneuen.2007.03.019.
16. Moberg, G.P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.*; Moberg, G.P., Mench, J.A., Eds.; CABI: Wallingford, 2000; pp. 1–21 ISBN 9780851993591.
17. Fink, G. Stress: Concepts, Definition and History. In *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*; Elsevier, 2017; pp. 549–555 ISBN 9780080450469.
18. Levine, S. Stress: an historical perspective. In *Handbook of Stress and the Brain: Part 1: The Neurobiology of Stress*; 2005; pp. 3–23.
19. Holmes, F.L. Claude Bernard, the milieu intérieur, and regulatory physiology. *Hist. Philos. Life Sci.* 1986, 8, 3–25.
20. Cannon, W.B. Stress and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 1935, 189, 13–14, doi:10.1097/00000441-193501000-00001.
21. Seley, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 1936, 138, 32, doi:10.1038/138032a0.
22. Romero, L.M.; Wingfield, J.C. Environment and the Earth. In *Tempests, Poxes, Predators, and People*; Oxford University Press, 2015; pp. 3–22 ISBN 9780195366693.
23. Romero, L.M.; Platts, S.H.; Schoech, S.J.; Wada, H.; Crespi, E.; Martin, L.B.; Buck, C.L. Understanding stress in the healthy animal-potential paths for progress. *Stress* 2015, 18, 491–497, doi:10.3109/10253890.2015.1073255.
24. Ralph, C.R.; Tilbrook, A.J. The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J. Anim. Sci.* 2016, 94, 457–470, doi:10.2527/jas.2015-9645.
25. Romero, L.M. Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 2004, 19, 249–255, doi:10.1016/j.tree.2004.03.008.
26. Day, T.A. Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: No help from allostasis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 2005, 29, 1195–1200, doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.005.

27. Charmandari, E.; Tsigos, C.; Chrousos, G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 2005, 67, 259–284, doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
28. Reeder, D.M.; Kramer, K.M. Stress in Free-Ranging Mammals: Integrating Physiology, Ecology, and Natural History. *J. Mammal.* 2005, 86, 225–235, doi:10.1644/BHE-003.1.
29. Doewes, R.I.; Gangadhar, L.; Subburaj, S. An overview on stress neurobiology: Fundamental concepts and its consequences. *Neurosci. Informatics* 2021, 1, 100011, doi:10.1016/j.neuri.2021.100011.
30. Godoy, L.D.; Rossignoli, M.T.; Delfino-Pereira, P.; Garcia-Cairasco, N.; Umeoka, E.H. de L. A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. *Front. Behav. Neurosci.* 2018, 12, 1–23, doi:10.3389/fnbeh.2018.00127.
31. Anisman, H.; Merali, Z. Understanding stress: characteristics and caveats. *Alcohol Res. Health* 1999, 23, 241–9.
32. Romero, L.M.; Butler, L.K. *Endocrinology of Stress; 2007; Vol. 20;*
33. Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000, 21, 55–89, doi:10.1210/er.21.1.55.
34. Romero, L.M.; Wingfield, J.C. The Classic Stress Response. In *Tempests, Poxes, Predators, and People*; Oxford University Press, 2015; pp. 115–148.
35. Cannon, W.B. *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement;* D Appleton & Company: New York, 1915;
36. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
37. Manteca, X. Emociones y estrés. In *Bienestar Animal; Multimédiva Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 21–34 ISBN 978-84-96344-96-9.*
38. Cook, C.J.; Mellor, D.J.; Harris, P.J.; Ingram, J.R.; Matthews, L.R. Hands-on and hands-off measurement of stress. In *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.*; CABI: Wallingford, 2000; pp. 123–146 ISBN 9780851993591.
39. Zobba, R.; Ardu, M.; Niccolini, S.; Cubeddu, F.; Dimauro, C.; Bonelli, P.; Dedola, C.; Visco, S.; Pinna Parpaglia, M.L. Physical, Hematological, and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2011, 31, 542–548, doi:10.1016/j.jevs.2011.03.010.



40. Miglio, A.; Falcinelli, E.; Mezzasoma, A.M.; Cappelli, K.; Mecocci, S.; Gresele, P.; Antognoni, M.T. Effect of first long-term training on whole blood count and blood clotting parameters in thoroughbreds. *Animals* 2021, 11, 1–13, doi:10.3390/ani11020447.
41. Gordon, M.E.; McKeever, K.H.; Betros, C.L.; Manso Filho, H.C. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. *Vet. J.* 2007, 173, 532–540, doi:10.1016/j.tvjl.2006.01.003.
42. Piccione, G.; Casella, S.; Giannetto, C.; Messina, V.; Monteverde, V.; Caola, G.; Guttadauro, S. Haematological and haematochemical responses to training and competition in standardbred horses. *Comp. Clin. Path.* 2010, 19, 95–101, doi:10.1007/s00580-009-0902-z.
43. Gormally, B.M.G.; Romero, L.M. What are you actually measuring? A review of techniques that integrate the stress response on distinct time-scales. *Funct. Ecol.* 2020, 34, 2030–2044, doi:10.1111/1365-2435.13648.
44. Romero, L.M.; Reed, J.M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2005, 140, 73–79, doi:10.1016/j.cbpb.2004.11.004.
45. Gröschl, M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin. Chem.* 2008, 54, 1759–1769, doi:10.1373/clinchem.2008.108910.
46. Hellhammer, D.H.; Wüst, S.; Kudielka, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34, 163–171, doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
47. Ralph, M.R.; Foster, R.G.; Davis, F.C.; Menaker, M. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science* (80-. ). 1990, 247, 975–978, doi:10.1126/science.2305266.
48. Guo, H.; Brewer, J.M.; Champhekar, A.; Harris, R.B.S.; Bittman, E.L. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, 102, 3111–3116, doi:10.1073/pnas.0409734102.
49. Murphy, B.A. Circadian and Circannual Regulation in the Horse: Internal Timing in an Elite Athlete. *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 76, 14–24, doi:10.1016/j.jevs.2019.02.026.
50. Bohák, Z.; Szabó, F.; Beckers, J.F.; Melo de Sousa, N.; Kutasi, O.; Nagy, K.; Szenci, O. Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2013, 45, 38–42, doi:10.1016/j.domaniend.2013.04.001.
51. Contreras-Aguilar, M.D.; Lamy, E.; Escribano, D.; Cerón, J.J.; Tecles, F.; Quiles, A.J.; Hevia, M.L. Changes in salivary analytes of horses due to circadian rhythm and season: A pilot study. *Animals* 2020, 10, 1–8, doi:10.3390/ani10091486.

52. Cordero, M.; Brorsen, B.W.; McFarlane, D. Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2012, 43, 317–324, doi:10.1016/j.domaniend.2012.05.005.
53. Lassourd, V.; Gayrard, V.; Laroute, V.; Alvinerie, M.; Benard, P.; Courtot, D.; Toutain, P.L. Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 1996, 271, R25–R33, doi:10.1152/ajpregu.1996.271.1.R25.
54. Irvine, C.H.G.; Alexander, S.L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1994, 11, 227–238, doi:10.1016/0739-7240(94)90030-2.
55. Erber, R.; Wulf, M.; Aurich, J.; Rose-Meierhöfer, S.; Hoffmann, G.; von Lewinski, M.; Möstl, E.; Aurich, C. Stress response of three-year-old horse mares to changes in husbandry system during initial equestrian training. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 1088–1094, doi:10.1016/j.jevs.2013.04.008.
56. Gardill, B.R.; Vogl, M.R.; Lin, H.Y.; Hammond, G.L.; Muller, Y.A. Corticosteroid-Binding Globulin: Structure-Function Implications from Species Differences. *PLoS One* 2012, 7, doi:10.1371/journal.pone.0052759.
57. Clow, A.; Smyth, N. *Salivary cortisol as a non-invasive window on the brain*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2020; Vol. 150; ISBN 9780128167526.
58. Fratto, M.A.; Hart, K.A.; Norton, N.A.; Barton, M.H.; Giguère, S.; Hurley, D.J. The effect of free and carrier-bound cortisol on equine neutrophil function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2017, 183, 16–21, doi:10.1016/j.vetimm.2016.11.003.
59. Alexander, S.L.; Irvine, C.H.G. The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: The importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *J. Endocrinol.* 1998, 157, 425–432, doi:10.1677/joe.0.1570425.
60. Hart, K.A.; Barton, M.H.; Ferguson, D.C.; Berghaus, R.; Slovis, N.M.; Heusner, G.L.; Hurley, D.J. Serum Free Cortisol Fraction in Healthy and Septic Neonatal Foals. 2011, 345–355.
61. Spencer, R.L.; Deak, T. A users guide to HPA axis research. *Physiol. Behav.* 2017, 178, 43–65, doi:10.1016/j.physbeh.2016.11.014.
62. Calixto, C.; Martinez, F.E.; Jorge, S.M.; Moreira, A.C.; Martinelli, C.E. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J. Pediatr.* 2002, 140, 116–118, doi:10.1067/mpd.2002.120765.
63. Dzviti, M.; Mapfumo, L.; Muchenje, V. Relationship between saliva and blood cortisol in handled cows. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2019, 32, 734–741, doi:10.5713/ajas.18.0151.

64. Peeters, M.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Ledoux, D.; Vandenheede, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* 2011, 43, 487–493, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x.
65. Kedzierski, W.; Cywińska, A.; Strzelec, K.; Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* 2014, 85, 313–317, doi:10.1111/asj.12146.
66. Bushong, D.M.; Friend, T.H.; Knabe, D.A. Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab. Anim.* 2000, 34, 171–181, doi:10.1258/002367700780457482.
67. Christensen, J.W.; Beekmans, M.; van Dalum, M.; VanDierendonck, M. Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses. *Physiol. Behav.* 2014, 128, 39–45, doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.024.
68. Becker-Birck, M.; Schmidt, A.; Lasarzik, J.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013, 8, 87–94, doi:10.1016/j.jveb.2012.05.002.
69. Jastrzębska, E.; Wolska, A.; Minero, M.; Ogluska, M.; Earley, B.; Wejer, J.; Górecka-Bruzda, A. Conflict Behavior in Show Jumping Horses: A Field Study. *J. Equine Vet. Sci.* 2017, 57, 116–121, doi:10.1016/j.jevs.2017.07.009.
70. Kędzierski, W.; Strzelec, K.; Cywińska, A.; Kowalik, S. Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 1106–1109, doi:10.1016/j.jevs.2013.04.011.
71. Janczarek, I.; Bereznowski, A.; Strzelec, K. The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013, 16, 533–541, doi:10.2478/pjvs-2013-0074.
72. Contreras-Aguilar, M.D.; Cerón, J.J.; Muñoz, A.; Ayala, I. Changes in saliva biomarkers during a standardized increasing intensity field exercise test in endurance horses. *Animal* 2021, 15, 100236, doi:10.1016/j.animal.2021.100236.
73. de Mira, M.C.; Lamy, E.; Santos, R.; Williams, J.; Pinto, M.V.; Martins, P.S.; Rodrigues, P.; Marlin, D. Salivary cortisol and eye temperature changes during endurance competitions. *BMC Vet. Res.* 2021, 17, 1–12, doi:10.1186/s12917-021-02985-9.

74. Schmidt, A.; Hödl, S.; Möstl, E.; Aurich, J.; Müller, J.; Aurich, C. Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naive horses during repeated road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2010, 39, 205–213, doi:10.1016/j.domaniend.2010.06.002.
75. Nagel, C.; Melchert, M.; Aurich, J.; Aurich, C. Road Transport of Late-Pregnant Mares Advances the Onset of Foaling. *J. Equine Vet. Sci.* 2020, 86, doi:10.1016/j.jevs.2019.102894.
76. Glauser, A.; Burger, D.; van Dorland, H.A.; Gyga, L.; Bachmann, I.; Howald, M.; Bruckmaier, R.M. No increased stress response in horses on small and electrically fenced paddocks. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2015, 167, 27–34, doi:10.1016/j.applanim.2015.03.008.
77. Schmidt, A.; Aurich, J.; Möstl, E.; Müller, J.; Aurich, C. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Horm. Behav.* 2010, 58, 628–636, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.011.
78. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019, 270, 10–17, doi:10.1016/j.ygcen.2018.09.016.
79. Stalder, T.; Kirschbaum, C. Analysis of cortisol in hair - State of the art and future directions. *Brain. Behav. Immun.* 2012, 26, 1019–1029, doi:10.1016/j.bbi.2012.02.002.
80. Russell, E.; Koren, G.; Rieder, M.; Van Uum, S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012, 37, 589–601, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.009.
81. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. Within a hair's breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020, 288, 113359, doi:10.1016/j.ygcen.2019.113359.
82. Tallo-Parra, O.; Manteca, X.; Sabes-Alsina, M.; Carbajal, A.; Lopez-Bejar, M. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal* 2015, 9, 1059–1064, doi:10.1017/S1751731115000294.
83. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. Is it getting in the hair? – Cortisol concentrations in native, regrown and segmented hairs of cattle and pigs after repeated ACTH administrations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020, 295, 113534, doi:10.1016/j.ygcen.2020.113534.
84. Duran, M.C.; Janz, D.M.; Waldner, C.L.; Campbell, J.R.; Marques, F.J. Hair Cortisol Concentration as a Stress Biomarker in Horses: Associations With Body Location and Surgical Castration. *J. Equine Vet. Sci.* 2017, 55, 27–33, doi:10.1016/j.jevs.2017.03.220.

85. González-de-la-Vara, M. del R.; Valdez, R.A.; Lemus-Ramírez, V.; Vázquez-Chagoyán, J.C.; Villa-Godoy, A.; Romano, M.C. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* 2011, 75, 216–221.
86. Comin, A.; Veronesi, M.C.; Montillo, M.; Faustini, M.; Valentini, S.; Cairoli, F.; Prandi, A. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in horse foals. *Vet. J.* 2012, 194, 131–132, doi:10.1016/j.tvjl.2012.04.006.
87. Lafferty, D.J.R.; Laudenslager, M.L.; Mowat, G.; Heard, D.; Belant, J.L. Sex, diet, and the social environment: Factors influencing hair cortisol concentration in free-ranging black bears (*Ursus americanus*). *PLoS One* 2015, 10, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0141489.
88. Bacci, M.L.; Nannoni, E.; Govoni, N.; Scorrano, F.; Zannoni, A.; Forni, M.; Martelli, G.; Sardi, L. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod. Biol.* 2014, 14, 218–223, doi:10.1016/j.repbio.2014.06.001.
89. Ventrella, D.; Elmi, A.; Barone, F.; Carnevali, G.; Govoni, N.; Bacci, M.L. Hair testosterone and cortisol concentrations in pre-and post-rut roe deer bucks: Correlations with blood levels and testicular morphometric parameters. *Animals* 2018, 8, doi:10.3390/ani8070113.
90. Banse, H.E.; Getachew, F.; Levy, M.; Smits, J. Influence of season and pituitary pars intermedia dysfunction on hair cortisol concentration in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2019, doi:10.1016/j.domaniend.2019.07.003.
91. Gardela, J.; Carbajal, A.; Tallo-Parra, O.; Olvera-Maneu, S.; Álvarez-Rodríguez, M.; Jose-Cunilleras, E.; López-Béjar, M. Temporary Relocation during Rest Periods: Relocation Stress and Other Factors Influence Hair Cortisol Concentrations in Horses. *Animals* 2020, 10, 642, doi:10.3390/ani10040642.
92. Mazzola, S.M.; Colombani, C.; Pizzamiglio, G.; Cannas, S.; Palestrini, C.; Costa, E.D.; Gazzonis, A.L.; Bionda, A.; Crepaldi, P. Do you think i am living well? A four-season hair cortisol analysis on leisure horses in different housing and management conditions. *Animals* 2021, 11, 1–13, doi:10.3390/ani11072141.
93. Sauveroche, M.; Henriksson, J.; Theodorsson, E.; Svensson Holm, A.-C.; Roth, L.S.V. Hair cortisol in horses (*Equus caballus*) in relation to management regimes, personality, and breed. *J. Vet. Behav.* 2020, 37, 1–7, doi:10.1016/j.jveb.2019.12.002.
94. Placci, M.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Mondo, E.; Borghetti, P.; De Angelis, E.; Accorsi, P.A. Natural Horse Boarding Vs Traditional Stable: A Comparison of Hormonal, Hematological and Immunological Parameters. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2020, 23, 366–377, doi:10.1080/10888705.2019.1663737.

95. Lanci, A.; Mariella, J.; Ellero, N.; Faoro, A.; Peric, T.; Prandi, A.; Freccero, F.; Castagnetti, C. Hair Cortisol and DHEA-S in Foals and Mares as a Retrospective Picture of Feto-Maternal Relationship under Physiological and Pathological Conditions. *Animals* 2022, 12, 1266, doi:10.3390/ani12101266.
96. Sollberger, S.; Ehlert, U. How to use and interpret hormone ratios. *Psychoneuroendocrinology* 2016, 63, 385–397, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.031.
97. Leary, C.J.; Knapp, R. The stress of elaborate male traits: Integrating glucocorticoids with androgen-based models of sexual selection. *Anim. Behav.* 2014, 89, 85–92, doi:10.1016/j.anbehav.2013.12.017.
98. Mehta, P.H.; Prasad, S. The dual-hormone hypothesis: A brief review and future research agenda. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2015, 3, 163–168, doi:10.1016/j.cobeha.2015.04.008.
99. Mehta, P.H.; Josephs, R.A. Testosterone and cortisol jointly regulate dominance: Evidence for a dual-hormone hypothesis. *Horm. Behav.* 2010, 58, 898–906, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.020.
100. Handa, R.J.; Weiser, M.J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Front. Neuroendocrinol.* 2014, 35, 197–220, doi:10.1016/j.yfrne.2013.11.001.
101. Daly, W.; Seegers, C.A.; Rubin, D.A.; Dobridge, J.D.; Hackney, A.C. Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2005, 93, 375–380, doi:10.1007/s00421-004-1223-1.
102. Toufexis, D.; Rivarola, M.A.; Lara, H.; Viau, V. Stress and the reproductive axis. *J. Neuroendocrinol.* 2014, 26, 573–586, doi:10.1111/jne.12179.
103. Crewther, B.; Keogh, J.; Cronin, J.; Cook, C. Possible Stimuli for Strength and Power Adaptation. *Sport. Med.* 2012, 464–467, doi:10.1109/apmc.2001.985413.
104. Whitham, J.C.; Bryant, J.L.; Miller, L.J. Beyond Glucocorticoids: Integrating Dehydroepiandrosterone (DHEA) into Animal Welfare Research. *Animals* 2020, 10, 1381, doi:10.3390/ani10081381.
105. Prough, R.A.; Clark, B.J.; Klinge, C.M. Novel mechanisms for DHEA action. *J. Mol. Endocrinol.* 2016, 56, R139–R155, doi:10.1530/JME-16-0013.
106. Aurich, J.; Wulf, M.; Ille, N.; Erber, R.; von Lewinski, M.; Palme, R.; Aurich, C. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2015, 52, 11–16, doi:10.1016/j.domaniend.2015.01.003.

107. Soma, L.R.; Uboh, C.E.; You, Y.; Guan, F.; McDonnell, S. Plasma concentrations of testosterone and nandrolone in racing and nonracing intact male horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2012, 35, 132–138, doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01295.x.
108. Claes, A.; Ball, B.A.; Corbin, C.J.; Conley, A.J. Age and season affect serum testosterone concentrations in cryptorchid stallions. *Vet. Rec.* 2013, 173, 168, doi:10.1136/vr.101706.
109. Hannan, M.A.; Murase, H.; Sato, F.; Tsogtgerel, M.; Kawate, N.; Nambo, Y. Age related and seasonal changes of plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone from birth to early-puberty in Thoroughbred male horses. *Theriogenology* 2019, 132, 212–217, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.04.014.
110. Waddington, B.; Penitente-Filho, J.M.; Neves, J.G.S.; Pinho, R.O.; Chaya, A.Y.; Maitan, P.P.; Silveira, C.O.; Neves, M.G.; Guimarães, S.E.F.; de Carvalho, G.R.; et al. Testosterone serum profile, semen characteristics and testicular biometry of Mangalarga Marchador stallions in a tropical environment. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52, 335–343, doi:10.1111/rda.12918.
111. Munk, R.; Jensen, R.B.; Palme, R.; Christensen, J.W. The effect of sex and time of day on testosterone concentrations in equine saliva and serum. *Comp. Exerc. Physiol.* 2016, 12, 177–182, doi:10.3920/cep160020.
112. Negretti, C.; Dm, S.; Tm, H.; Ma, K. Comparison of Serum and Hair Testosterone Concentrations in Free-Roaming Stallions Corresponding author: Kutzler MA, Department of Animal and Rangeland Sciences, College of Agricultural. 2019, 7, 5–7.
113. Sharma, O.P. Diurnal Variations of Plasma Testosterone in Stallions. *Biol. Reprod.* 1976, 15, 158–162, doi:10.1095/biolreprod15.2.158.
114. Berndtson, W.E.; Pickett, B.W.; Nett, T.M. Reproductive physiology of the stallion. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. *Reproduction* 1974, 39, 115–118, doi:10.1530/jrf.0.0390115.
115. Baker, H.W.G.; Baker, I.D.C.; Epstein, V.M.; Hudson, B. Effect of stress on steroid hormone levels in racehorses. *Aust. Vet. J.* 1982, 58, 70–71, doi:10.1111/j.1751-0813.1982.tb02692.x.
116. Golland, L.C.; Evans, D.L.; Stone, G.M.; Tyler-McGowan, C.M.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J. Maximal exercise transiently disrupts hormonal secretory patterns in Standardbred geldings. *Equine Vet. J.* 2010, 31, 581–585, doi:10.1111/j.2042-3306.1999.tb05288.x.
117. Ayala, I.; Martos, N. Changes in serum dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, and 17 $\beta$ -oestradiol levels associated with disease and surgery in the horse. *Acta Vet. Brno* 2013, 82, 91–96, doi:10.2754/avb201382010091.

118. Swink, J.M.; Rings, L.M.; Snyder, H.A.; McAuley, R.C.; Burns, T.A.; Dembek, K.A.; Gilseman, W.F.; Browne, N.; Toribio, R.E. Dynamics of androgens in healthy and hospitalized newborn foals. *J. Vet. Intern. Med.* 2021, 35, 538–549, doi:10.1111/jvim.15974.
119. Arena, I.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Bucci, D.; Accorsi, P.A. Assessment of horses' welfare: Behavioral, hormonal, and husbandry aspects. *J. Vet. Behav.* 2021, 41, 82–90, doi:10.1016/j.jveb.2021.01.006.
120. Wheeler, M.J. A Short History of Hormone Measurement. In; 2013; pp. 1–6.
121. Karashima, S.; Osaka, I. Rapidity and Precision of Steroid Hormone Measurement. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 956, doi:10.3390/jcm11040956.
122. Wudy, S.A.; Schuler, G.; Sánchez-Guijo, A.; Hartmann, M.F. The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2018, 179, 88–103, doi:10.1016/j.jsbmb.2017.09.003.
123. Wallace, M. Measurement of hormones. In *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*; Wass, J.A.H., Stewart, P.M., Amiel, S.A., Davies, M.J., Eds.; Oxford University Press, 2011; pp. 45–53 ISBN 9780199235292.
124. Hillebrand, J.J.; Wickenhagen, W. V; Heijboer, A.C. Improving Science by Overcoming Laboratory Pitfalls With Hormone Measurements. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2021, 106, e1504–e1512, doi:10.1210/clinem/dgaa923.
125. Sharma, A.; Gautam, S.; Bandyopadhyay, N. *Enzyme Immunoassays: Overview*; Second Edi.; Elsevier, 2014; Vol. 1; ISBN 9780123847331.
126. Yalow, R.S.; Berson, S.A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* 1959, 184, 1648–1649, doi:10.1038/1841648b0.
127. Buchanan, K.L.; Goldsmith, A.R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Anim. Behav.* 2004, 67, 183–185, doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.002.
128. Cook, N.J. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* 2012, 92, 227–259, doi:10.4141/cjas2012-045.
129. Cook, N.J. Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* 2012, 92, 227–259, doi:10.4141/cjas2012-045.
130. Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C.G.; et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 2007, 92, 317–339, doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.003.



131. McCallister, J.; Smith, T.E. Validation of non-invasive cortisol enzyme-immunoassays in Callitrichid primates. 3rd Annu. Symp. Zoo Res. 1996.
132. Koren, L.; Bryan, H.; Matas, D.; Tinman, S.; Fahlman, Å.; Whiteside, D.; Smits, J.; Wynne-Edwards, K. Towards the validation of endogenous steroid testing in wildlife hair. *J. Appl. Ecol.* 2019, 56, 547–561, doi:10.1111/1365-2664.13306.
133. Sink, T.D.; Lochmann, R.T.; Fecteau, K.A. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiol. Biochem.* 2008, 34, 95–101, doi:10.1007/s10695-007-9150-9.
134. Todini, L.; Malfatti, A.; Salimei, E.; Fantuz, F. Measurement of thyroid hormones in donkey (*Equus asinus*) blood and milk: Validation of ELISA kits and evaluation of sample collection, handling and storage. *J. Dairy Res.* 2010, 77, 419–424, doi:10.1017/S0022029910000646.
135. Carezzi, C.; Verga, M. Animal welfare: review of the scientific concept and definition. *Ital. J. Anim. Sci.* 2009, 8, 21–30, doi:10.4081/ijas.2009.s1.21.
136. Lund, V.; Coleman, G.; Gunnarsson, S.; Appleby, M.C.; Karkinen, K. Animal welfare science—Working at the interface between the natural and social sciences. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2006, 97, 37–49, doi:10.1016/j.applanim.2005.11.017.
137. Broom, D.M. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* 1991, 69, 4167–4175, doi:10.2527/1991.69104167x.
138. Manteca, X. Concepto de bienestar animal. In *Bienestar Animal*; Multimèdica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 13–20 ISBN 978-84-96344-96-9.
139. Brambell, F.W. Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems; 1965;
140. FAWC Updates the five freedoms.; 1992;
141. Manteca, X. Introducción al bienestar animal. In *Bienestar Animal*; Multimèdica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 3–12 ISBN 978-84-96344-96-9.
142. Mellor, D.; Reid, C.S.. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. *Improving the well-being of animals in the research environment.* 1994, 3–18.
143. Mellor, D.J.; Beausoleil, N.J.; Littlewood, K.E.; McLean, A.N.; McGreevy, P.D.; Jones, B.; Wilkins, C. The 2020 five domains model: Including human–animal interactions in assessments of animal welfare. *Animals* 2020, 10, 1–24, doi:10.3390/ani10101870.

144. Manteca, X. Valoración del bienestar animal. In Bienestar Animal; Multimédica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 63–78.
145. Waran, N.; Randle, H. What we can measure, we can manage: The importance of using robust welfare indicators in Equitation Science. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 190, 74–81, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.016.
146. Hemsworth, P.; Mellor, D.; Cronin, G.; Tilbrook, A. Scientific assessment of animal welfare. *N. Z. Vet. J.* 2015, 63, 24–30, doi:10.1080/00480169.2014.966167.
147. Salas, M.; Manteca, X.; Abáigar, T.; Delclaux, M.; Enseñat, C.; Martínez-Nevado, E.; Quevedo, M.; Fernández-Bellon, H. Using Farm Animal Welfare Protocols as a Base to Assess the Welfare of Wild Animals in Captivity—Case Study: Dorcas Gazelles (*Gazella dorcas*). *Animals* 2018, 8, 111, doi:10.3390/ani8070111.
148. Mononen, J.; Möller, S.; Hansen, S.; Hovland, A.; Koistinen, T.; Lidfors, L.; Malmkvist, J.; Vinke, C.; Ahola, L. The development of on-farm welfare assessment protocols for foxes and mink: the WelFur project. *Anim. Welf.* 2012, 21, 363–371, doi:10.7120/09627286.21.3.363.
149. Clegg, I.; Borger-Turner, J.; Eskelinen, H. C-Well: The development of a welfare assessment index for captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim. Welf.* 2015, 24, 267–282, doi:10.7120/09627286.24.3.267.
150. Botreau, R.; Veissier, I.; Butterworth, A.; Bracke, M.B.M.; Keeling, L.J. Definition of criteria for overall assessment of animal welfare. *Anim. Welf.* 2007, 16, 225–228





**OBJECTIUS**



Els objectius de la present tesi doctoral són:

1. Caracteritzar les variacions estacionals de cortisol, testosterona i sulfat de deshidroepiandrosterona i les seves ràtios en pèl al llarg d'un any com a mesura retrospectiva de l'activitat dels eixos hipotalàmic-hipofisiari-adrenal i gonadal.
2. Caracteritzar la resposta d'estrès a través de l'anàlisi del cortisol salival, plasmàtic, i un estudi hematològic complet en cavalls durant una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals de Menorca.
3. Caracteritzar la resposta d'estrès mitjançant l'anàlisi del cortisol salival en cavalls durant la celebració de les festes patronals de Maó.
4. Dissenyar, descriure i adaptar l'aplicació d'un protocol que permeti l'avaluació del benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca de forma objectiva i pràctica.



# HIPOTESİ





De les diverses aproximacions a l'estudi de la resposta d'estrès en cavalls, els indicadors fisiològics, i més concretament l'anàlisi de les hormones esteroidals, han sigut uns dels indicadors més utilitzats en equitació en els últims temps. No obstant això, la caracterització fisiològica de la resposta d'estrès dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca resta per ser explorada. Així doncs, els cavalls participants en les festes patronals, de la mateixa manera que els cavalls que participen en altres disciplines eqüestres, estarien exposats a una sèrie de potencials factors estressants que generarien una resposta d'estrès transitòria mesurable a través de la quantificació d'hormones esteroidals, entre d'altres, i que són l'objecte principal d'estudi en la present tesi doctoral.



# CAPÍTOL I





# **Hair Cortisol, Testosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Their Ratios in Stallions as a Retrospective Measure of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal and Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axes Activity: Exploring the Influence of Seasonality**

Sergi Olvera-Maneu<sup>1</sup>, Annaïs Carbajal<sup>1</sup>, Jaume Gardela<sup>1</sup>, Manel López-Béjar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Health and Anatomy, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences, 309 East Second Street, Pomona, CA 91766, USA

Chapter adapted from the paper published in *Animals*

(*Animals* 2021, 11(8), 2202; <https://doi.org/10.3390/ani11082202>)

## ABSTRACT

The monitoring of stress physiology includes studying a wide range of endocrinological mechanisms, which can be assessed using multiple tissue samples. This study aimed to evaluate the seasonal variations of hair cortisol (C), testosterone (T) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in horses for a whole year, as well as to assess the variations between seasons of C/DHEA-S and T/C ratios as a retrospective measure of the hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes activity. Ten pure-breed Menorca stallions were included in the study. The hair samples were collected approximately every two months ( $60.1 \pm 7.3$  days; mean  $\pm$  SD) following the shave-reshave method caudally to the sternum. After a methanol-based extraction, samples were analyzed by enzyme immunoassay for cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate. Following our findings, we detected that C, T and DHEA-S were significantly affected by seasonality, with the highest values of C during summer and the lowest values of T during spring. The DHEA-S concentrations were increased in autumn compared to the other studied periods. Additionally, the studied hormone ratios showed variations between seasons. To conclude, season should, therefore, be considered when assessing sexual and stress hormones in stallion hair, since this variable can be a potential influencing factor and lead to misinterpretations.

## INTRODUCTION

Monitoring a horse's endocrine status can provide valuable information on its welfare, sexual and health conditions [1]. Recently, there has been growing attention on those endocrine systems that interfere with each other in complex dynamic ways [2], such as the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axes. Hence, assessing simultaneously hormones that are thought to co-regulate with each other, such as those secreted by HPA and HPG activation, would be postulated as a better approach to physiological stress measurements [2,3].

Cortisol, the main glucocorticoid in mammals [4,5], is commonly used as a physiological indicator of stress, since it is secreted after the activation of the HPA axis in response to a situation in which homeostasis is threatened by the actions of various external or internal stressors [5,6]. Additionally, with the activation of the HPA axis, other components, such as DHEA and its sulfate ester (DHEA-S), are released into bloodstream [3]. Both DHEA and DHEA-S have been characterized as glucocorticoid antagonists, and are considered as indicators of resilience, because of their anti-aging, immune-enhancing and neuroprotective functions [3]. Testosterone is the main sexual steroid in males and has been used as a stress indicator, since this hormone is negatively influenced by stressful living environments, impacting reproductive performance, growth rate, and immunity [7]. One common method to achieve a better approach to stress assessment is to calculate the ratio of various hormones [2]. Different studies have suggested the C/T ratio as a catabolic/anabolic equilibrium during physical fitness since T has primarily anabolic effects and C has catabolic functions [2]. On the other hand, C/DHEA ratio has been used as a more complete picture of the HPA activity and as a potential biomarker tool of resilience and allostatic load in livestock animals, including horses [3,8–10].

Steroid hormones, as those concerning this chapter, are commonly measured in matrices that reflect either current or recent circulating hormonal concentrations, such as blood, saliva, urine or faeces [5,11,12]. However, the assessment of hair steroid hormones is being increasingly used in domestic and wild species [13]. Measuring hair T, C, and DHEA-S, allows for the assessment of long-term endocrinological retrospective information and has been used as a compilation of HPG and HPA axis activity, respectively [5]. Steroid hormones, especially lipophilic hormones, are incorporated into the hair shaft through passive diffusion from blood and provides an approach to quantify circulating steroid hormones levels accumulated over the hair growth cycle [14,15]. Another advantage of using hair to measure steroid hormone variations is non-invasive and pain-



free sample collection [13,15]. Additionally, hair is a stable substrate with less variability than saliva or feces [5] and it can be stored during long periods at room temperature [15,16]. Therefore, measuring steroid hormones in hair is unaffected by circadian variations in the hormone or by factors inducing short-term hormonal variations [14,15].

Several studies in domestic and wild mammals have revealed different sources of variation in hair steroids levels [13], depending on hair specific characteristics (e.g., body region [17], hair growth phase [18], or colour [19,20]), intrinsic animal-based characteristics (e.g., age [19,21], sex [22,23] or reproductive status [24,25]) and, finally, external factors (e.g., season [26,27]). All of the previously presented components should be considered when using hair to assess hormonal levels as stress indicators. Previous studies have examined hair cortisol concentrations (HCC) as a presumptive measure of stress, and demonstrated their seasonal fluctuations in horses [18,22,27,28]. Few studies have been performed using T [11,28–30] and, to date, to the best of our knowledge, there is no information published on the seasonal variations in the hair T levels of horses. Although the C/DHEA ratio has been previously described in horse's hair to evaluate the effect of different housing conditions [8], there is still a lack of information on its biological relevance in the horse.

In the present study, we aimed to evaluate the seasonal variations in hair C, T and DHEA-S in horses for a whole year, as well as to assess the variations between seasons of C/DHEA-S and T/C ratios as a retrospective measure of the hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axis activity.

## MATERIALS & METHODS

### Horses, housing, diet, handling, and ethical considerations

Ten pure-breed Menorca stallions, a black coated and autochthonous breed from the island of Menorca (Spain), were included in the study. The animals were aged between eight and twelve years old. All individuals were healthy, and no symptoms of illness were detected from at least one month before the beginning of the study. The body condition score (BCS) was evaluated using the 0 (emaciated) to 5 (extremely fat) BCS scale [31]. For all the stallions evaluated in the present study, BCS was 3 (moderate to good body condition). Additionally, a daily observation of the animals was performed by the owners and a general physical examination was performed the sampling days by a veterinarian (S.O.-M). Horses were habitually housed in *Centro Ecuestre Equimar* (Maó, Menorca, Spain) in individual indoor stables of 10.5 m<sup>2</sup> with no cooling or heating elements during the different seasons. No changes in facility and housing conditions were carried out during

the whole study. Individuals were fed with a similar commercial horse diet 3 times per day with ad libitum access to hay and running water. The horses from the study were all destined to perform the same type of equestrian discipline, specifically horses were habitually used to Menorca dressage discipline. Horses were managed following the principles and guidelines of the Ethics Committee on Animal and Human Experimentation from the *Universitat Autònoma de Barcelona* (Spain) and following the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. No other manipulation, different to shaving a small area of the abdomen, was performed and, additionally, informed consent from the horses' owners was obtained before the initiation of the study.

## **Hair samples**

Hair samples were collected every two months ( $60.1 \pm 7.3$  days; mean  $\pm$  SD) from December 2018 to November 2019. Therefore, six samples ( $n = 6$ ) per individual were collected during the study period (samples were chronologically identified as P1 to P6, corresponding, respectively, to late autumn–early winter, winter, spring, late spring–early summer, summer, and autumn). Samples were collected using the “shave-reshave” method, consisting of shaving the selected area at the beginning of the study and re-shaving the regrown hair in the same area after the time of interest [27]. Specifically, a  $7 \times 7$  cm area was shaved caudally to the sternum using an electric clipper as close as possible to the skin ( $0.5 \pm 0.5$  mm). While the sampling procedure was performed by a veterinarian (S.O.-M.), an assistant was holding a piece of paper under the electric clipper to collect the hair that was being shaved. The animals tolerated the shaving process well and no fear reactions were noticed during the sampling procedure. The electric clipper was cleaned between individuals with 70% ethanol to avoid cross-contamination. Body location was selected to prevent potential injuries with the mount, to avoid visible aesthetic defects in the horses, and to avoid faecal and urine contamination [27]. Samples were stored in individually identified paper envelopes at room temperature until sample processing.

## **Hair steroid extraction**

For the hair steroid extraction, a previous modified and validated protocol from our laboratory was used [20]. First, 250 mg of hair were weighed using a precision scale. Each hair sample was washed by adding 2.5 mL of isopropanol (2-propanol 99.5%, Scharlau, Barcelona, Spain) and vortexed at  $145 \times g$  for 2.5 min to remove external steroid sources. Then, the supernatant was separated by decantation. The samples were washed 3 times. Hair samples were left at room temperature for approximately 36 h to dry completely. The dried hair was milled using a ball mill

(MM200, Retsch, Haan, Germany). After that, 50 mg of the milled hair was mixed with 1.5 mL of pure methanol and incubated in an orbital shaker at 36 °C and 100 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA) 18 h for the steroid extraction. Samples were then centrifuged at  $9500 \times g$  for 5 min, and 0.750 mL of the supernatant were transferred into a new micro-tube until complete evaporation. Once the process was completed, the dried extracts were reconstituted with 0.2 mL enzyme immunoassay (EIA) buffer provided by the commercial kit (see below) and stored at  $-20$  °C until assay analysis.

## **Hormone detection and biochemical validation tests**

Enzyme immunoassay kits (Neogen Corporation®, Ayr, UK) were used to quantify hair cortisol and testosterone concentrations (HCC and HTC, respectively). According to the manufacturer, the cross-reactivity of the EIA cortisol antibody with other steroids was prednisolone 47.4%, cortisone 15.7%, 11-deoxycortisol 15.0%, prednisone 7.83%, corticosterone 4.81%,  $6\beta$ -hydroxycortisol 1.37%, 17-hydroxyprogesterone 1.36%, deoxycorticosterone 0.94%. Steroids with a cross-reactivity  $<0.06\%$  are not presented. For the testosterone EIA kit, the cross-reactivity was androstenedione 0.86%, bolandiol 0.86%, testosterone enanthate 0.13%, estriol 0.10%, testosterone benzoate 0.10%, estradiol 0.05%, dehydroepiandrosterone 0.04%, testosterone propionate 0.04%, deoxycorticosterone 0.03%, testosterone  $17\beta$ -cypionate 0.02%. In this case, steroids with a cross-reactivity  $<0.02\%$  are not presented. For DHEA-S, an enzyme immunoassay kit (IBL International GmbH®, Hamburg, Germany) was used. According to the manufacturer, the cross-reactivity of the EIA DHEA-S antibody was androsterone sulfate 5.67%, estrone 2.62%, testosterone 2.13%, progesterone 0.93% and,  $17\text{-}\alpha$ -Hydroxyprogesteronsulfat 0.13%. Substances with a cross-reactivity  $<0.01\%$  are not presented. The criteria of precision, specificity, accuracy, and sensitivity were followed to carry out the biochemical validation of the assays [32].

The validation tests were performed using a constituted pool made with 60  $\mu\text{L}$  from each sample of the study. The precision for C, T and DHEA-S was assessed by calculating intra-assay coefficients of variation from all duplicated samples analysed. For cortisol, the linearity of the dilution was assessed using 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 dilutions of the pool with the EIA buffer. The spike-and-recovery test was calculated by adding to 100, 75 and 25  $\mu\text{L}$  of the pool, volumes of 25, 75 and 100  $\mu\text{L}$  of three standard cortisol concentrations provided by the EIA kit (0.2, 0.4 and 1 ng/mL), respectively. For testosterone, the specificity of the test was assessed by calculating the linearity of the dilution using 1:10, 1:20, 1:40, 1:100 dilutions of the pool with the EIA buffer. Accuracy was assessed through the spike-and-recovery test, calculated by adding to 100, 75 and 25  $\mu\text{L}$  of the pool, volumes of 25, 75 and 100  $\mu\text{L}$  of three standard testosterone concentrations

provided by the EIA kit (0.02, 0.04 and 0.08 ng/mL). Finally, for DHEA-S, the same procedure as followed for C and T was carried out. The linearity of the dilution was assessed using 1:1, 1:2, 1:4, and 1:6 dilutions of the pool with the EIA buffer. The spike-and-recovery test was calculated by adding to 100, 75 and 25  $\mu$ L of the pool, volumes of 25, 75 and 100  $\mu$ L of three standard DHEA-S concentrations provided by the EIA kit (0.3, 0.9 and 2.7 ng/mL), respectively. Finally, the sensitivity for C, T and DHEA-S was given by the smallest amount of hormonal concentration detected.

## **Statistical analysis**

Data were analyzed using RStudio software (R version 3.4.4) and, graphically represented using GraphPad Prism software (version 8.0.2). For the biochemical validation, Pearson's Product Moment correlation was used to evaluate the relationship between the expected and obtained values from serial dilutions of the pool with EIA buffer of C, T, and DHEA-S, respectively. The normality of the data was evaluated using a Shapiro–Wilk test and concentrations were  $\log_{10}$  transformed, when necessary, to achieve the normal distribution. A Linear Model was used to evaluate the effect of seasonality on hair C, T and DHEA-S concentrations. The period of the year (P1-P6) was considered as fixed factor and the individual as a block. A post hoc test over periods was performed using Tukey's multiple comparison test. For the assessment of C/DHEA-S and T/C ratios, the same model as exposed before was computed. A Tukey multiple comparison test was then performed. Finally, the relationships between hormones (C, T and DHEA-S) were explored using Pearson's Product Moment correlation. Data are presented as mean  $\pm$  SEM unless otherwise stated. The significance level in all data was set at  $p < 0.05$ .

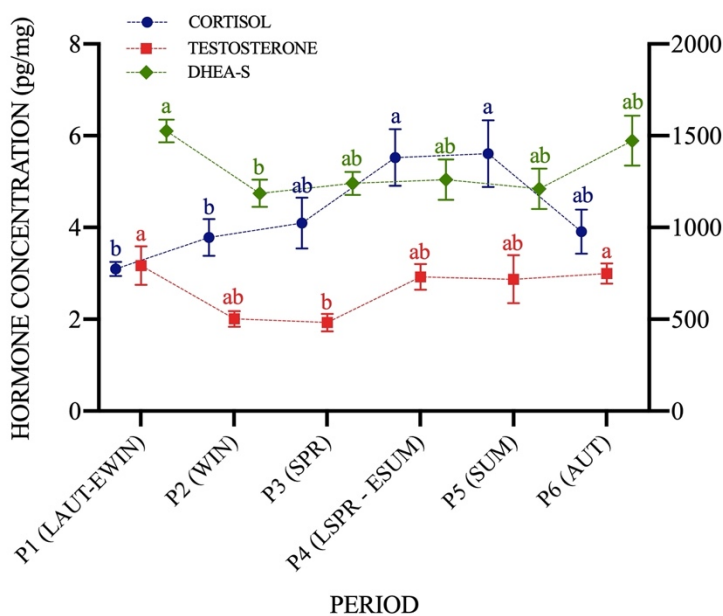
# **RESULTS**

## **Biochemical validation of the enzyme immunoassays**

The intra-assay CV was 8.1% for cortisol, 4.9% for testosterone and 3.7% for DHEA-S. The dilution test revealed a significant correlation between the observed and the theoretical values for C (Pearson's correlation;  $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ), T (Pearson's correlation;  $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ) and DHEA-S (Pearson's correlation;  $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ) concentrations. In the spike-and-recovery test, the pool spiked with the hormone standards presented a mean recovery percentage of  $113.6 \pm 25.1\%$  (mean  $\pm$  SD) for C,  $99.7 \pm 2.2\%$  (mean  $\pm$  SD) for T, and  $122.9 \pm 15.2\%$  (mean  $\pm$  SD) for DHEA-S. Sensitivity was 0.013 ng/mL, 0.002 ng/mL, 0.017  $\mu$ g/mL for C, T and DHEA-S, respectively.

## Seasonal Effect on Hair C, T and DHEA-S Concentrations

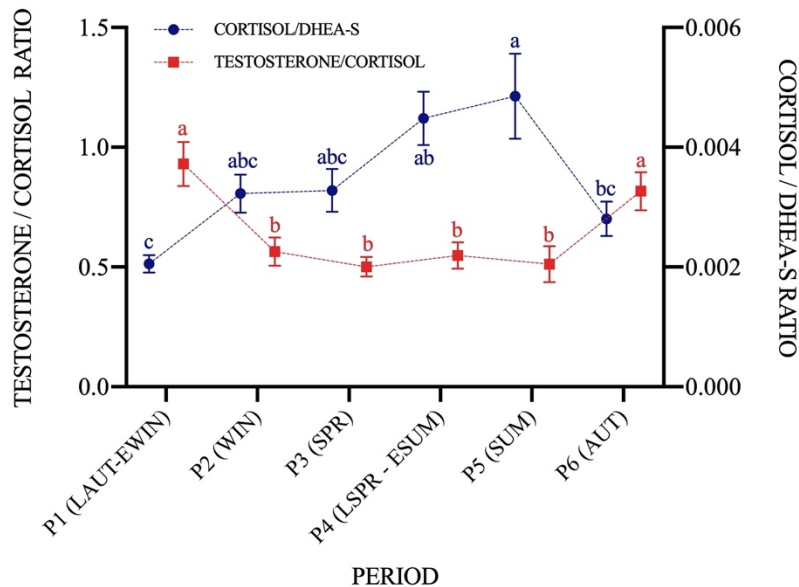
Hair C, T and DHEA-S were significantly affected by season ( $p < 0.05$ ) (Figure 1). HCC, from late spring–early summer (P4) ( $5.5 \pm 0.6$  pg cortisol/mg hair) and summer (P5) ( $5.6 \pm 0.7$  pg cortisol/mg hair) were significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to late autumn–early winter (P1) ( $3.0 \pm 0.1$  pg cortisol/mg hair) and winter (P2) ( $3.8 \pm 0.4$  pg cortisol/mg hair). HTC were higher ( $p < 0.05$ ) in late autumn–early winter (P1) ( $3.1 \pm 0.4$  pg testosterone/mg hair) and autumn (P6) ( $3.0 \pm 0.2$  pg testosterone/mg hair) when compared to the spring concentrations (P3) ( $1.9 \pm 0.2$  pg testosterone/mg hair). DHEA-S from late autumn–early winter (P1) ( $1525.8 \pm 61.9$  pg DHEA-S/mg hair) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those concentrations obtained from winter (P2) ( $1186.3 \pm 74.4$  pg DHEA-S/mg hair).



**Figure 1.** Hair cortisol (blue), testosterone (red) and DHEA-S (green) concentrations during the studied period (P1; late autumn–early winter, P2; winter, P3; spring, P4; late spring–early summer, P5; summer, P6; autumn). Data are graphically presented as mean  $\pm$  SEM. Left axis represent hair cortisol and testosterone concentrations (pg/mg of hair), while right axis represent DHEA-S concentrations (pg/mg of hair). Different letters represent significant differences between periods ( $p < 0.05$ ).

## Seasonal Variations of Hair C/DHEA-S and T/C Ratios

Both C/DHEA-S and T/C ratios were significantly affected by season ( $p < 0.01$ ) (Figure 2). The C/DHEA-S ratio was significantly higher in summer (P5) compared to autumn (P6) and late autumn–early winter (P1). The T/C ratio obtained from late autumn–early winter (P1) and autumn (P6) were higher to those C/T ratios obtained from P2, P3, P4, and P5.



**Figure 2.** The hair C/DHEA-S (blue) and T/C ratio (red) variations during the studied period (P1; late autumn-early winter, P2; winter, P3; spring, P4; late spring-early summer, P5; summer, P6; autumn). Data are graphically presented as mean  $\pm$  SEM. Left axis represent T/C ratio and right axis represent C/DHEA-S ratio. Different letters represent significant differences between periods ( $p < 0.05$ ).

## Hormone Correlations

The Pearson's product moment correlation coefficient revealed a positive correlation between HTC and HCC ( $r = 0.43$ ;  $p < 0.05$ ). No significant correlations between HTC and DHEA-S or HCC and DHEA-S were found ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

The use of hair to assess cortisol concentrations has become increasingly popular in many mammal species [13], but the analysis of sexual hormones and other steroids similar to DHEA-S has been less employed. To the authors' knowledge, this is the first study that monitors the seasonal variations in T, DHEA-S, C/DHEA-S and T/C ratios in horse hair. The individuals of this study were all the same breed and sex (stallions), had similar age and same coat color (black), and were housed in the same stable under similar management and nutritional conditions. All these conditions were selected to reduce some of the potential sources of variation in steroid hormone concentrations [13,18]. Following our findings, we detected that C, T and DHEA-S were significantly affected by seasonality, with the highest values of C during summer and the lowest

values of T during spring. The hair DHEA-S concentrations were increased in late autumn–early winter compared to winter.

Seasonal variations in HCC have been reported previously, suggesting higher HCC in autumn [17] and summer [27]. In accordance, the present results based on the sample analysis across seasons, suggests seasonal differences in HCC. We detected a progressive increase in HCC from winter to summer. The present results could be due to seasonal differences in the environmental and physical (e.g., exercise) conditions affecting long-term cortisol secretion [18]. Horses, with centuries of selection for their aptitudes, still face to potential anthropological stressful situations [33]. Horses of the present study were habitually used in the Menorca dressage discipline. More specific, during summer, horses took part in the centuries-old patron saint festivals held every summer in Menorca (Spain). The participation of these animals into the festivals implied a significant increase in the amount of exercise compared to the other seasons. Previous studies on humans [34] showed how exhaustive training over a period increased steroid hormone concentrations in the hair. On the other hand, previous literature has suggested exercise in horses as a potential stressor [34,36,37]. Even changes in blood and salivary cortisol reflect acute stressful events, the repeated activation of the HPA axis in response to repeated stressful events could result in elevated HCC [19,35]. Regarding our results, it could be observed that HCC were lower in cold periods (P1 and P2) than in other seasonal periods, coinciding with a lower exercise rate of the studied horses during cold weather. The present results would suggest a possible relation between exercise and higher HCC. On the other hand, environmental conditions would play an important role in hormonal secretion [18]. Some of the environmental factors proposed are temperature, humidity, daylight duration and weather conditions in general, but also there is a potential influence of management or individual factors in relation to the environment, such as nutrition, behavior, and metabolism [13,18]. The ambient temperature outside of the thermoneutral zone has been postulated as one of the main climatic stressors for horses [36]. To date, as far as we know, there is no literature available on how environmental factors, such as temperature, humidity, or daylight duration, affect HCC in the adult horse. However, these factors have been studied in foals during the perinatal period, and no significant effect on the HCC measured at birth or at 30 days of age was found [37]. In a previous study carried out in our laboratory [27], it was observed that, variations in HCC for horses located in the same climatic region as our animals were similar to those stated in the present study. The similarities in both studies reinforce the hypothesis of a marked seasonality reflected in HCC in stallions located in the Western Mediterranean region.

Seasonal variations in horse testosterone levels have been previously reported in blood [30,38], and faeces [11], although there is a limited evidence of how testosterone changes seasonally. In the horse, long days stimulate the gonadal function reaching the maximal activity in spring and summer [30,39]. Contrary to expectation, we did not detect higher HTC during spring or summer. Our results showed a lower HTC in spring (P3) compared to autumn and early winter (P1 and P6). Although we should be cautious when comparing studies using different matrixes and methodologies, our results are not in accordance with previous results [11,30], which detected higher testosterone concentrations during the breeding season in blood and faeces. The stallions from this study, even though all of them were sexually mature [39,40], were not used to breed during the study. The housing conditions, individually indoors and stabled in separated boxes, did not allow for visual contact with females or geldings. These circumstances could have interfered with the generation of sexual stimuli, leading to the increase in testosterone levels during the breeding season. Additionally, domestication and breeding selection could have reduced seasonal changes in reproductive functions in horses [41], whereas in wild and preserved breeds, or horses living outdoors, the strong seasonality could be more preserved [42].

DHEA-S showed different accumulation values in hair between seasons. Different species have shown seasonal variation in their blood DHEA-S concentrations (e.g., red squirrels or birds [43,44]) attributed to territorial behaviors since DHEA-S can be rapidly converted into sexual steroid promoters, among others, of sexual conduct [43]. The scarce information available of DHEA-S seasonal variations highlights the results obtained in this study. The variations of DHEA-S, observed in horse hair, may have a protective function by counteracting cortisol's effects, related to the presence of recurrent or chronic stressors [3,45], as has been previously suggested in horses [8], pigs [7], and cows [10,46].

The T/C ratio has been suggested to be an indicator of the general imbalance between the mutually inhibiting HPG and HPA axes [2]. The T/C ratio has been suggested as a predictor of aggressive behavior in different mammal species [47–49]. Additionally, different studies in humans applied this ratio as a general indicator of the catabolic/anabolic equilibrium during physical fitness since both hormones have antagonistic metabolic functions [2]. Concerning our results, a significant decrease from the late autumn–early winter compared to winter was observed and the ratio T/C increased from summer to autumn. Additionally, HTC and HCC were positively correlated in this study. To the best of our knowledge, the present study is the first to report a seasonal correlation of HCC and HTC. Previously, Aurich et al. [30] reported a weak but positive significant correlation between blood testosterone and salivary cortisol. Mehta et al. suggested that the levels of



glucocorticoids were related to the effectiveness of testosterone functions [47,48]. When cortisol levels are high, the relationships between high testosterone and sexual behaviors tend to break down [47–49]. Taken together, we suggest, therefore, that an environmentally driven increase in HCC may mediate a related increase in HTC in stallions, maybe in an attempt of physiologically coping with a stressful situation.

C/DHEA-S ratio showed variations among seasons. These results may indicate different interferences between both steroids when the HPA axis was activated. The C/DHEA-S ratio has been proposed as a complementary stress indicator, since DHEA-S has a wide range of opposite effects to those produced by glucocorticoids [3]. In addition, C/DHEA-S has been postulated as a potential biomarker of resilience and allostatic load [3]. Only a few studies have been carried out in ungulates, especially on cows [10,46] and horses [8], exposing how unfavorable environmental conditions and animal management lead to an increase in the C/DHEA-S ratio. Although the present study does not focus on the behavioral observations, this study provides valuable information on the importance of considering seasonality when designing studies using hair as integrative retrospective matrix, even for calculating hormone ratios.

## CONCLUSIONS

To conclude, the results of this study highlight that hair C, T and DHEA concentrations in horses change significantly among seasons. While, for HCC, we report a progressive increase in concentrations from winter to summer, with the highest values of cortisol during summer; for HTC, the lowest levels of testosterone were detected during spring. DHEA-S showed a decrease during winter compared to the last period of autumn. Hormonal ratios have been successfully assessed in horse hair and we suggest them as a complementary approach to physiological stress measurements. Additionally, the ratios evaluated in this paper (T/C and C/DHEA-S) have showed seasonal variations. Finally, it is worth remarking that season should be considered as an influencing factor when analyzing sexual and stress hormones in hair, as has been described in the present study.

## REFERENCES

1. Murphy, B.A. Circadian and Circannual Regulation in the Horse: Internal Timing in an Elite Athlete. *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 76, 14–24, doi:10.1016/j.jevs.2019.02.026.
2. Sollberger, S.; Ehlert, U. How to use and interpret hormone ratios. *Psychoneuroendocrinology* 2016, 63, 385–397, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.031.
3. Whitham, J.C.; Bryant, J.L.; Miller, L.J. Beyond Glucocorticoids: Integrating Dehydroepiandrosterone (DHEA) into Animal Welfare Research. *Animals* 2020, 10, 1381, doi:10.3390/ani10081381.
4. Ralph, C.R.; Tilbrook, A.J. Invited Review: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J. Anim. Sci.* 2016, 94, 457–470, doi:10.2527/jas.2015-9645.
5. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
6. Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002, 23, 67–74, doi:10.1016/S0739-7240(02)00146-7.
7. Bergamin, C.; Comin, A.; Corazzin, M.; Faustini, M.; Peric, T.; Scollo, A.; Gottardo, F.; Montillo, M.; Prandi, A. Cortisol, DHEA, and Sexual Steroid Concentrations in Fattening Pigs' Hair. *Animals* 2019, 9, 345, doi:10.3390/ani9060345.
8. Placci, M.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Mondo, E.; Borghetti, P.; De Angelis, E.; Accorsi, P.A. Natural Horse Boarding Vs Traditional Stable: A Comparison of Hormonal, Hematological and Immunological Parameters. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2020, 23, 366–377, doi:10.1080/10888705.2019.1663737.
9. Fels, M.; Rauterberg, S.; Schwennen, C.; Ligges, U.; Herbrandt, S.; Kemper, N.; Schmicke, M. Cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in saliva: Endocrine biomarker for chronic stress in pigs? *Livest. Sci.* 2019, 222, 21–24, doi:10.1016/j.livsci.2019.01.022.
10. Peric, T.; Corazzin, M.; Romanzin, A.; Bovolenta, S.; Prandi, A.; Montillo, M.; Comin, A. Cortisol and DHEA concentrations in the hair of dairy cows managed indoor or on pasture. *Livest. Sci.* 2017, 202, 39–43, doi:10.1016/j.livsci.2017.05.020.
11. Khalil, A.M.; Nakahara, K.; Tokuriki, M.; Kaseda, Y.; Murakami, N. Variation in fecal testosterone hormone concentration with season and harem size in Misaki feral horses. *J. Vet. Med. Sci.* 2009, 71, 1075–1078, doi:10.1292/jvms.71.1075.

12. Palme, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim. Welf.* 2012, 21, 331–337, doi:10.7120/09627286.21.3.331.
13. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019, 270, 10–17, doi:10.1016/j.ygcen.2018.09.016.
14. Stalder, T.; Steudte, S.; Miller, R.; Skoluda, N.; Dettenborn, L.; Kirschbaum, C. Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology* 2012, 37, 602–610, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.08.007.
15. Stalder, T.; Kirschbaum, C. Analysis of cortisol in hair - State of the art and future directions. *Brain. Behav. Immun.* 2012, 26, 1019–1029, doi:10.1016/j.bbi.2012.02.002.
16. Webb, E.; Thomson, S.; Nelson, A.; White, C.; Koren, G.; Rieder, M.; Van Uum, S. Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair. *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 807–812, doi:10.1016/j.jas.2009.11.010.
17. Duran, M.C.; Janz, D.M.; Waldner, C.L.; Campbell, J.R.; Marques, F.J. Hair Cortisol Concentration as a Stress Biomarker in Horses: Associations With Body Location and Surgical Castration. *J. Equine Vet. Sci.* 2017, 55, 27–33, doi:10.1016/j.jevs.2017.03.220.
18. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. Within a hair's breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020, 288, 113359, doi:10.1016/j.ygcen.2019.113359.
19. González-de-la-Vara, M. del R.; Valdez, R.A.; Lemus-Ramirez, V.; Vázquez-Chagoyán, J.C.; Villa-Godoy, A.; Romano, M.C. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* 2011, 75, 216–221.
20. Tallo-Parra, O.; Manteca, X.; Sabes-Alsina, M.; Carbajal, A.; Lopez-Bejar, M. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal* 2015, 9, 1059–1064, doi:10.1017/S1751731115000294.
21. Comin, A.; Veronesi, M.C.; Montillo, M.; Faustini, M.; Valentini, S.; Cairoli, F.; Prandi, A. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in horse foals. *Vet. J.* 2012, 194, 131–132, doi:10.1016/j.tvjl.2012.04.006.
22. Fourie, N.H.; Brown, J.L.; Jolly, C.J.; Phillips-Conroy, J.E.; Rogers, J.; Bernstein, R.M. Sources of variation in hair cortisol in wild and captive non-human primates. *Zoology* 2016, 119, 119–125, doi:10.1016/j.zool.2016.01.001.

23. Lafferty, D.J.R.; Laudenslager, M.L.; Mowat, G.; Heard, D.; Belant, J.L. Sex, diet, and the social environment: Factors influencing hair cortisol concentration in free-ranging black bears (*Ursus americanus*). *PLoS One* 2015, 10, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0141489.
24. Bacci, M.L.; Nannoni, E.; Govoni, N.; Scorrano, F.; Zannoni, A.; Forni, M.; Martelli, G.; Sardi, L. Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod. Biol.* 2014, 14, 218–223, doi:10.1016/j.repbio.2014.06.001.
25. Ventrella, D.; Elmi, A.; Barone, F.; Carnevali, G.; Govoni, N.; Bacci, M.L. Hair testosterone and cortisol concentrations in pre-and post-rut roe deer bucks: Correlations with blood levels and testicular morphometric parameters. *Animals* 2018, 8, doi:10.3390/ani8070113.
26. Banse, H.E.; Getachew, F.; Levy, M.; Smits, J. Influence of season and pituitary pars intermedia dysfunction on hair cortisol concentration in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2019, doi:10.1016/j.domaniend.2019.07.003.
27. Gardela, J.; Carbajal, A.; Tallo-Parra, O.; Olvera-Maneu, S.; Álvarez-Rodríguez, M.; Jose-Cunilleras, E.; López-Béjar, M. Temporary Relocation during Rest Periods: Relocation Stress and Other Factors Influence Hair Cortisol Concentrations in Horses. *Animals* 2020, 10, 642, doi:10.3390/ani10040642.
28. Munk, R.; Jensen, R.B.; Palme, R.; Christensen, J.W. The effect of sex and time of day on testosterone concentrations in equine saliva and serum. *Comp. Exerc. Physiol.* 2016, 12, 177–182, doi:10.3920/cep160020.
29. Waddington, B.; Penitente-Filho, J.M.; Neves, J.G.S.; Pinho, R.O.; Chaya, A.Y.; Maitan, P.P.; Silveira, C.O.; Neves, M.G.; Guimarães, S.E.F.; de Carvalho, G.R.; et al. Testosterone serum profile, semen characteristics and testicular biometry of Mangalarga Marchador stallions in a tropical environment. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52, 335–343, doi:10.1111/rda.12918.
30. Aurich, J.; Wulf, M.; Ille, N.; Erber, R.; von Lewinski, M.; Palme, R.; Aurich, C. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2015, 52, 11–16, doi:10.1016/j.domaniend.2015.01.003.
31. Carroll, C.L.; Huntington, P.J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.* 1988, 20, 41–45, doi:10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x.
32. Buchanan, K.L.; Goldsmith, A.R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Anim. Behav.* 2004, 67, 183–185, doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.002.

33. Becker-Birck, M.; Schmidt, A.; Lasarzik, J.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013, 8, 87–94, doi:10.1016/j.jveb.2012.05.002.
34. Skoluda, N.; Dettenborn, L.; Stalder, T.; Kirschbaum, C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* 2012, 37, 611–617, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.001.
35. Schubach, K.M.; Cooke, R.F.; Brandao, A.P.; Lippolis, K.; Hinchliff, M.T.; Bohnert, D.W.; Cerri, R.L.A. Using hair cortisol concentrations to assess the adrenocortical stress response in beef cattle administered corticotrophin-release hormone. *J. Anim. Sci.* 2016, 94, 109–109, doi:10.2527/jam2016-0230.
36. Cymbaluk, N.F.; Christison, G.I. Environmental effects on thermoregulation and nutrition of horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1990, doi:10.1016/S0749-0739(17)30546-1.
37. Montillo, M.; Comin, A.; Corazzin, M.; Peric, T.; Faustini, M.; Veronesi, M.C.; Valentini, S.; Bustaffa, M.; Prandi, A. The Effect of temperature, rainfall, and light conditions on hair cortisol concentrations in newborn foals. *J. Equine Vet. Sci.* 2014, 34, 774–778, doi:10.1016/j.jevs.2014.01.011.
38. Hannan, M.A.; Murase, H.; Sato, F.; Tsogtgerel, M.; Kawate, N.; Nambo, Y. Age related and seasonal changes of plasma concentrations of insulin-like peptide 3 and testosterone from birth to early-puberty in Thoroughbred male horses. *Theriogenology* 2019, 132, 212–217, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.04.014.
39. Gerlach, T.; Aurich, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 58, 197–213, doi:10.1016/S0378-4320(99)00093-7.
40. Roser, J.F. Endocrine basis for testicular function in the stallion. *Theriogenology* 1997, 48, 883–892.
41. Schmidt, K.; Deichsel, K.; de Oliveira, R.A.; Aurich, J.; Ille, N.; Aurich, C. Effects of environmental temperature and season on hair coat characteristics, physiologic and reproductive parameters in Shetland pony stallions. *Theriogenology* 2017, 97, 170–178, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.035.
42. Brinkmann, L.; Gerken, M.; Riek, A. Adaptation strategies to seasonal changes in environmental conditions of a domesticated horse breed, the Shetland pony (*Equus ferus caballus*). *J. Exp. Biol.* 2012, 215, 1061–1068, doi:10.1242/jeb.064832.

43. Boonstra, R.; Lane, J.E.; Boutin, S.; Bradley, A.; Desantis, L.; Newman, A.E.M.; Soma, K.K. Plasma DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008, 158, 61–67, doi:10.1016/j.ygcen.2008.05.004.
44. Hau, M.; Stoddard, S.T.; Soma, K.K. Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird. *Horm. Behav.* 2004, 45, 40–49, doi:10.1016/j.yhbeh.2003.08.002.
45. Arena, I.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Bucci, D.; Accorsi, P.A. Assessment of horses' welfare: Behavioral, hormonal, and husbandry aspects. *J. Vet. Behav.* 2021, 41, 82–90, doi:10.1016/j.jveb.2021.01.006.
46. Almeida, P.E.; Weber, P.S.D.; Burton, J.L.; Zanella, A.J. Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2008, 34, 89–99, doi:10.1016/j.domaniend.2006.11.006.
47. Mehta, P.H.; Josephs, R.A. Testosterone and cortisol jointly regulate dominance: Evidence for a dual-hormone hypothesis. *Horm. Behav.* 2010, 58, 898–906, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.020.
48. Mehta, P.H.; Prasad, S. The dual-hormone hypothesis: A brief review and future research agenda. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2015, 3, 163–168, doi:10.1016/j.cobeha.2015.04.008.
49. Leary, C.J.; Knapp, R. The stress of elaborate male traits: Integrating glucocorticoids with androgen-based models of sexual selection. *Anim. Behav.* 2014, 89, 85–92, doi:10.1016/j.anbehav.2013.12.017.



## CAPÍTOL II







# **Variations of Cortisol and Hematological Parameters to Estimate the Physiological Stress Response in Horses Following a Training Session to Participate in a Traditional Equestrian Event**

Sergi Olvera-Maneu<sup>1</sup>, Annaïs Carbajal<sup>1</sup>, Manel López-Béjar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Health and Anatomy, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences, 309 East Second Street, Pomona, CA 91766, USA

## ABSTRACT

In several places horses are still being used for traditional purposes. This is the case of the centuries-old equestrian celebrations held in Menorca (Spain). In the present study, we aimed to evaluate the variations of salivary and plasma cortisol, and the variations of the complete blood count to estimate the physiological stress response in stallions following a one-hour training session to participate in the Menorca patronal festivals. Cortisol concentrations in saliva and plasma were measured by an enzyme-immunoassay and the hematological parameters by using a commercial fully automated hematology cell counter. Cortisol concentrations at the end of the training session increased significantly, compared to pre-training levels (from  $1.20 \pm 0.33$  to  $4.01 \pm 0.69$  nmol/L for saliva, and from  $31.82 \pm 10.97$  to  $55.79 \pm 12.01$  nmol/L for plasma (mean  $\pm$  SEM;  $p < 0.05$ ). Within the two hours after finishing the training session, salivary cortisol returned to baseline levels ( $1.62 \pm 0.31$  nmol/L;  $p > 0.05$ ). on the other hand, plasma cortisol levels returned completely to baseline levels within the 24 hours after finishing the training session. Thus, monitoring the salivary cortisol levels might be a better approach to monitor the resumption of baseline cortisol concentrations after an exercise in horses. Some of the evaluated hematological parameters (red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin) also increased significantly at the end of the training session ( $p < 0.05$ ). Overall, the present results provide a valuable basis for future research on the physiological implications of horses used for traditional festivals.

## INTRODUCTION

Because of their resistance and athletic aptitudes, horses have been historically used for various anthropogenic purposes, from warfare, transport, and fieldwork in the past, to recreational and sports activities nowadays [1]. However, horses are still being used for traditional purposes in some places.

In Menorca (Balearic Islands, Spain), every summer, since at least the XIV<sup>th</sup> century, traditional equestrian celebrations, popularly known as patronal festivals, are held in honor of the cities' patron saints. The patronal festivals are celebrated once a year in each of the eleven towns of Menorca. The main character of the patronal festivals is the Menorca Pure-bred stallion, a black coated breed, officially classified by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food as an endangered autochthonous breed. In 2020, there were approximately 3000 individuals mainly located in Menorca. The perpetuation through centuries of these events has prompted the maintenance and the improvement of this endangered autochthonous horse breed and has led to the emergence of the Menorca dressage. Menorca dressage is recognized by its most characteristic gait known as bot or walking courbette (Image 1a and 1b). During the festival days, the horses and their riders pass through the city's crowded streets. Once all the participants are gathered, the most popular event of the patronal festivals, known as jaleo (Image 1b), is celebrated in the main square. Horses at the festivals are exposed to potential sources of stress (e.g., crowded places (Image 1b), music, other non-cohabitant stallions, the exercise itself, between others.), and they can participate in more than one festival per year. Thus, the participant horses are trained over the year to be in their best possible physical condition to ensure their successful performance, welfare, and human safety at the patronal festival days.

Despite centuries of selection and domestication, horses still face a multitude of potential stressors when they are transported [2,3], trained [4,5], participate in competitions [6–8], or during the rider-horse interaction [9–11]. When an animal perceives a potential stressor, a response mediated by the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is initiated [4,12,13]. The activation of the HPA axis results, among others, in the secretion into the bloodstream of glucocorticoids following the secretion of catecholamines [4,12,13]. Cortisol, the primary glucocorticoid in horses, has several supportive and advantageous physiological roles that can be useful to the horses' tolerance to the short-term exercise demands [14]. Reducing inflammation, promoting metabolic activity, and increasing blood glucose levels are just a few of the beneficial effects of cortisol in exercised horses [4]. Cortisol can be measured in different

matrices [12,15,16]. In horses, cortisol has been frequently measured in the blood [17–20], and less commonly in urine [21], feces [22,23], hair [24–26], or saliva [27–29]. Cortisol assessment in blood and saliva allows on-time monitoring of HPA-axis activity and an indirect measure of the physiological stress reaction of the animal [12,15]. Blood cortisol is secreted by passive diffusion into saliva and gives ongoing feedback on free cortisol levels [19,30]. Hence, these matrices, blood, and saliva, are ideal for assessing short-term physiological stress reactions [31]. Furthermore, monitoring the changes in hematological parameters concerning the duration, frequency, intensity, and type of workloads in various equine disciplines has been the primary approach to assess the effect and efficacy of training [32,33]. Blood adaptations occur during physical activity to provide an appropriate delivery of oxygen and blood-borne substrates to muscles and remove metabolites and waste products [1].



Image 1a



Image 1b

**Image 1.** Menorca pure-breed stallion during the patronal festivals. The horses perform the most characteristic gait of the Menorca dressage and the patronal festivals: the bot or *walking courbette*. Image 1b also illustrates the most popular event of the festivals, commonly known as *jaleo*. Photo credits by: Catalina Pascual.

The stress response of the horses subjected to dressage training [34], race training [5,35], or jumping courses [34] has been well documented in the literature. However, the stress response of the horses trained to participate in traditional equestrian events, like those performed in Menorca, remains to be explored. The lack of specific studies in this field of equitation science offers an

opportunity to study the physiological stress response of horses trained to participate in these kind of events.

This study aimed to evaluate the variations of salivary and plasma cortisol, and the variations of the complete blood count to estimate the stress response in stallions following a one-hour training session to participate in the Menorca patronal festivals. We hypothesized that a one-hour training session would induce an increase in plasma and salivary cortisol concentrations and an adaptation of the hematological parameters to cope with the stress physiological demands produced by the training session.

## MATERIALS & METHODS

### **Animals, housing conditions, and ethics considerations**

A total of eight (n=8) individuals, housed in *Centro Ecuestre Equimar* (Maó, Menorca, Balearic Islands, Spain), were included in the study. The following inclusion criteria were established: a) Pure Breed Menorca stallion, b) Participant in the patronal festivals on a regular basis, and c) Absence of illness and lameness from at least one week before the beginning of the study.

The individuals were aged between eight and twelve years old. The body condition score (BCS) was evaluated using the 0 (emaciated) to 5 (extremely fat) scale [36]. For all the stallions evaluated in the present study, BCS was 3 (moderate to good body condition). Individuals were fed with a commercial horse diet three times per day with ad libitum access to hay and running water.

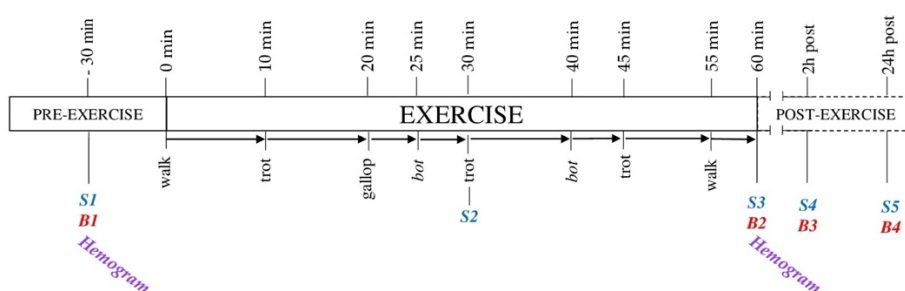
The study was conducted following the principles and guidelines of the Ethics Committee on Animal and Human Experimentation from the *Universitat Autònoma de Barcelona* (Barcelona, Spain) and following the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

### **Training schedule, environmental conditions, and salivary and blood sampling**

The exercise was designed as a standard one-hour training session to participate in the Menorca patronal festivals (Figure 1) and took place in an arena of 20 x 40 m. The arena was located in the same place as the stables (*Centro Ecuestre Equimar*), and all participant horses were well habituated to the environment where the training session was developed. The exercise was performed between 5 and 6 p.m. on August 30<sup>th</sup>, 2019. Mean day temperature was 25.6°C [T<sub>min</sub> 21°C – T<sub>max</sub> 30.2°C] and the mean relative humidity was 76% (record from *Agencia Estatal Meteorológica*, Ministry for the Ecological Transition and the Demographic Challenge, Spain). During the training

session, the horses were ridden by their regular rider to avoid additional sources of stress, and all the horses were exercised simultaneously.

Samples from each sampling time were collected within a range of 10 minutes to avoid potential sources of circadian cortisol variations [19]. As shown in Figure 1, saliva was collected to obtain the baseline values at rest [S1; 30 min before the exercise]. Then, during the exercise [S2; 30 min of exercise], at the end of the exercise [S3]; 2 hours [S4] and, 24 hours after the end of the exercise [S5]. Blood samples were collected to obtain the baseline values at rest [B1; 30 min before the exercise]. Then, at the end of the exercise [B2]; 2 hours post-exercise [B3], and finally, [B4] 24 after the end of the exercise. A complete blood count was performed from samples B1 and B2.



**Figure 1.** Schematical representation of the sampling timeline and the training session development. The upper part represents the chronogram of the session. The lower part indicates the gaits, duration, and collected samples. Sx (blue) for salivary samples and Bx (red) for plasma samples.

Saliva was collected using sterile mounted swabs (Sugi®, Eschenburg, Germany) specially designed to absorb secretions, rubbing both cheeks mucosa and under the tongue for twenty seconds. Saliva was recovered from the sterile swab placing it into a sterile syringe and pressing the plunger until the obtention of a minimum volume of 0.2 mL. Finally, samples were stored at -20°C until assayed. Blood samples were collected by jugular venipuncture with a 5mL syringe and 23G needle. For the complete blood count, samples were placed into EDTA blood collection tube (Eurotubo®, Deltalab, S.L. Barcelona, Spain) and the hematological parameters: red blood cells (RBC); hemoglobin (HGB); hematocrit (HCT); mean corpuscular volume (MCV); mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); white blood cells (WBC); lymphocytes (LYM); platelets (PLT); were analyzed. The analysis was computed using a commercial fully automated, species-specific benchtop hematology cell counter (ABACUS Junior VET™, Diatron). For the hormonal analysis, blood was placed into lithium heparinized blood collection tube (Eurotubo®, Deltalab, S.L. Barcelona, Spain) and centrifuged

at  $3000 \times g$  for 5 min. Plasma samples were transferred into a 1.5 mL microtube and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

## **Cortisol quantification and biochemical validation of the enzyme immunoassay**

Enzyme immunoassay kits (Neogen Corporation®, Ayr, UK) were used to quantify salivary and plasma cortisol concentrations. According to the manufacturer, cross-reactivity of the EIA cortisol antibody with other steroids was: prednisolone 47.4%, cortisone 15.7%, 11-deoxycortisol 15.0%, prednisone 7.83%, corticosterone 4.81%,  $6\beta$ -hydroxycortisol 1.37%, 17-hydroxyprogesterone 1.36%, deoxycorticosterone 0.94%. Steroids with a cross-reactivity  $<0.06\%$  are not presented. The precision, specificity, accuracy, and sensitivity criteria were followed to carry out the biochemical validation of the assays [37]. The validation tests were performed using a two constituted pool, one from saliva and another from plasma samples, created with  $30\mu\text{L}$  from each of the salivary samples and  $500\mu\text{L}$  from 6 plasma samples. The precision was assessed by calculating intra-assay coefficients of variation from all duplicated analyzed samples. The specificity of the test was tested by calculating the linearity of the dilution using 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 dilutions of the salivary pool diluted with the EIA buffer provided by the kit. For plasma, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:10 dilutions of the plasma pool with the EIA buffer provided by the kit were used. The accuracy was assessed through the spike-and-recovery test, calculated by adding to 100, 75, and 25  $\mu\text{L}$  of the salivary pool, volumes of 25, 75, and 100  $\mu\text{L}$  of three different cortisol concentrations provided by the EIA kit (0.2, 0.4, and 1 ng/mL). The spike-and-recovery test was calculated for plasma by adding to 100, 75, and 25  $\mu\text{L}$  of the plasma pool, volumes of 25, 75, and 100  $\mu\text{L}$  of three different cortisol concentrations provided by the EIA kit (0.4, 1, and 2 ng/mL). Finally, the sensitivity was given by the smallest cortisol concentration that the assay could detect and measure for both matrices.

## **Statistical analysis**

Data were analyzed using RStudio software (R version 3.4.4) and were graphically represented using GraphPad Prism software (version 8.0.2). For the data obtained in the dilution test and the spike and recovery test of the EIA biochemical validation, a Pearson's Product Moment correlation was applied between the expected and obtained values for saliva and plasma, respectively. The normality of the data was evaluated using a Shapiro-Wilk test, and concentrations were  $\log_{10}$  transformed to achieve the normal distribution. A Linear Mixed Effects Model was used to evaluate, for saliva and plasma respectively, the changes of cortisol concentrations. The sampling time was set as a fixed factor, and the individual was considered as a random factor. A posthoc Tukey's multiple comparison test was performed when the significance of the fixed factor



was stated. The interrelationship between salivary and plasma cortisol concentrations was calculated using a Pearson's Product Moment correlation. After testing the normality of the data by a Shapiro Wilk-test, changes in hematological parameters between the values obtained at rest [B1; 30 min before the exercise] and values obtained at the end of the training session [B2] were evaluated by using a paired t-test for RBC, HGB, HCT, MCV, MHC, MCHC, and WBC, and by a Wilcoxon signed-rank test for LYM and PLT. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

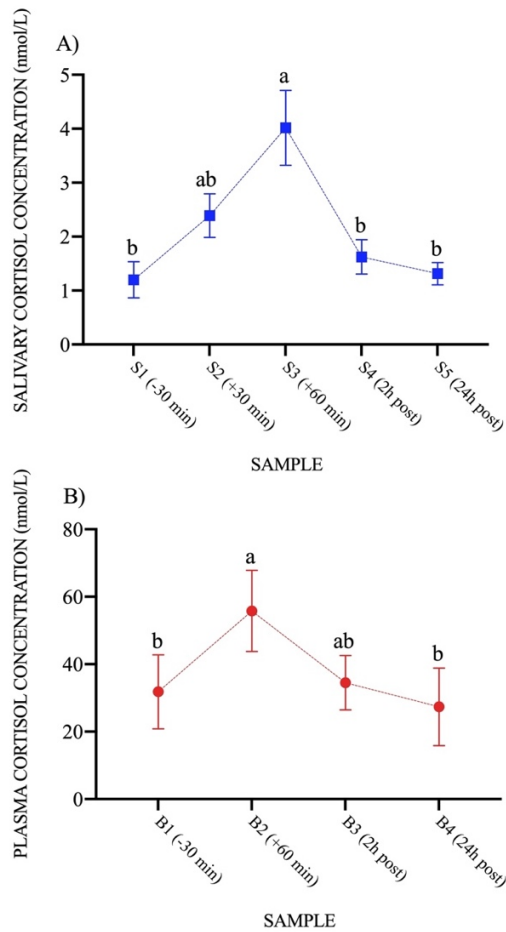
## RESULTS

### Biochemical validation

The assessed coefficient of variation was 8.20% and 4.91% for saliva and plasma, respectively. In the dilution test, the obtained and expected cortisol concentrations for saliva and plasma concentrations were significantly correlated ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ). In the spike-and-recovery test for saliva, the average of recovery percentage was  $107.6 \pm 10.0\%$ , and the obtained and theoretical concentrations were significantly correlated ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ). Regarding the spike-and-recovery test for plasma, the average of recovery percentage was  $97.34 \pm 10.6\%$ , and the obtained and theoretical concentration showed a significant correlation coefficient ( $r = 0.99$ ,  $p < 0.01$ ). The assay's sensitivity for salivary cortisol was 0.07, and 0.05 nmol/L for plasma. The biochemical validation of the EIA showed reliable results and demonstrated the assay's precision, specificity, accuracy, and sensitivity in measuring horse salivary and plasma cortisol.

### Salivary and plasma cortisol concentrations

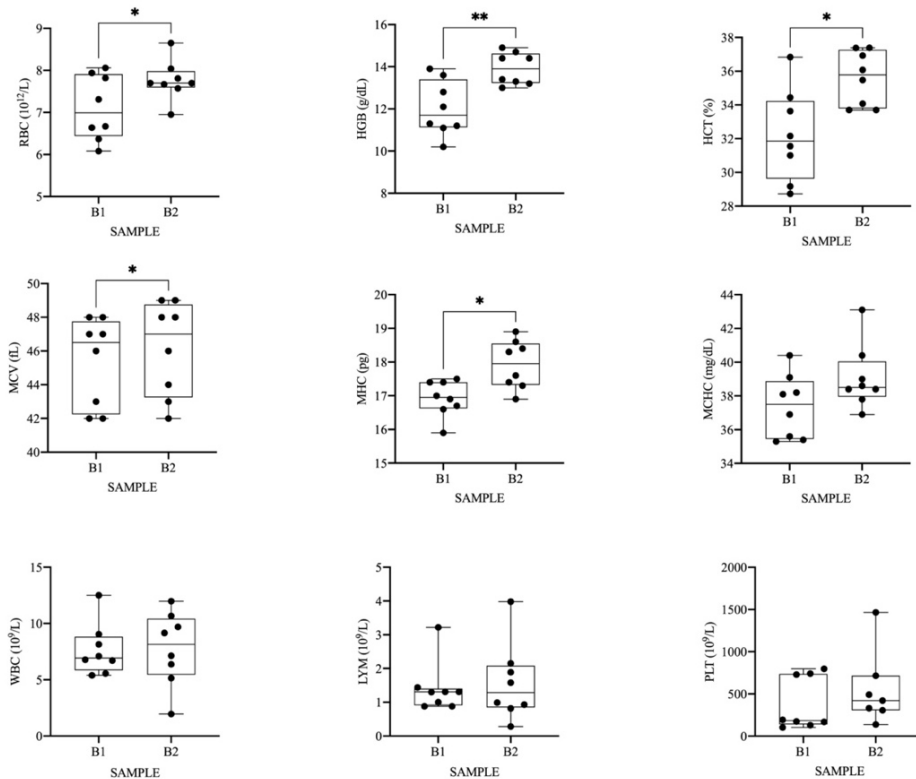
The results of salivary and plasma cortisol concentrations are presented in Figure 2. Salivary and plasma cortisol concentrations increased significantly after 60 min (S3, B2) of exercise ( $p < 0.05$ ) in comparison to the levels at rest (S1 and B1). Salivary cortisol concentrations detected 30 min after the start of the exercise did not differ significantly ( $p > 0.05$ ) from the values obtained at rest (S2 vs. S1, S4, and S5). Additionally, salivary cortisol concentrations returned to baseline levels within the two hours after finishing the exercise (S4 vs. S1 and S5). For plasma cortisol concentrations, values obtained two hours after the exercise (B3) did not differ significantly from samples B1 and B2 ( $p > 0.05$ ). Finally, the Pearson's product-moment correlation between salivary and plasma cortisol concentrations revealed a significant positive correlation ( $r = 0.67$ ;  $p < 0.001$ ).



**Figure 2.** A) Mean  $\pm$  SEM salivary cortisol concentrations (nmol/L) from the evaluated horses (n=8) at five different sampling times: [S1] 30 min before the exercise, [S2] after 30 min of exercise, [S3] at the end of the exercise; [S4] 2 hours and [S5] 24 hours post-exercise. B) Mean  $\pm$  SEM plasma cortisol concentrations (nmol/L) from the evaluated horses (n=8) at four different sampling times: [B1] 30 min before the exercise, [B2] at the end of the exercise; [B3] 2 hours and, [B4] 24 hours post-exercise. Different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between different sampling times.

## Hematological parameters

Hematological differences between B1 and B2 are presented in Figure 3. A significant increase in RBC, HGB, HCT, MCV, and MHC was detected ( $p < 0.05$ ). No significant differences in MCHC, WBC, LYM, and PLT were detected ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3.** Boxplot of red blood cells (RBC); hemoglobin (HGB); hematocrit (HCT); mean corpuscular volume (MCV); mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); white blood cells (WBC); lymphocytes (LYM); platelets (PLT) obtained 30 minutes before [B1] and at the end of the training session [B2]. Whiskers plot down to the minimum and up to the maximum value. Line plots the median, and boxes extend from the 25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentiles. The dots represent individual values. Asterisks indicate significant differences (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ) between different sampling times.

## DISCUSSION

In the last decades, the social interest in animal welfare has increased substantially. In this sense, several concerns have heightened over the use of animals in traditional celebrations. This is the case of the centuries-old Menorca patronal festivals. The participant stallions are trained over the year to participate in these events and must face different physiological demands during the festivals and the training sessions. In the present study we aimed to evaluate the variations of salivary, plasma cortisol, and hematological parameters (RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, WBC, LYM, and PLT) to estimate the physiological stress response in stallions following a one-hour training session to participate in the Menorca patronal festivals. The results of the present

paper describe how the stallions following a one-hour training session, a moderate-intensity exercise of intermediate duration compared with the proper activity performed during the festivals that last for more than 5 hours, produced a significant increase of the salivary and plasma cortisol values. Two hours after finishing the activity, salivary cortisol concentrations returned to baseline levels. Additionally, some of the evaluated hematological parameters (RBC, HGB, HCT, MCV, MHC) increased significantly compared to the pre-exercise levels. The present study provides new knowledge on the physiological stress response of the horses trained to participate in the patronal festivals, a particular use of horses not evaluated to date. Nonetheless, these results must be interpreted with caution because of the small sample size ( $n=8$ ) and the repeatability of the study since only a single exercise period was evaluated.

The use of cortisol to estimate the stress response is subjected to potential influencing factors that must be considered. In saliva and plasma, cortisol is secreted following a circadian pattern, a daily biological oscillation that peaks in the early morning and progressively decreases during the day with the lowest cortisol concentrations in the evening [19,38,39]. Because of that, all horses were exercised simultaneously, and the samples of all the studied individuals were taken within a range of 10 minutes. In horses, another situation that has been suggested to produce potential additive stress is the interaction and the expertise of their rider [9–11]. Consequently, horses of the present study were ridden by their regular riders. The arena conditions also have been suggested as a potential stressor for horses [29]. In this sense, the training session was developed at the stallions' stables arena, where the horses were well habituated to the environment. On the other hand, the day of the evaluated training session a mean temperature of 25.6°C [ $T_{min}$  21°C –  $T_{max}$  30.2°C] with a mean relative humidity of 76% was registered (record from Agencia Estatal Meteorológica; Ministry for the Ecological Transition and the Demographic Challenge, Spain). Climate conditions have been shown to play an important role in the physiological stress response to exercise in horses and their adaptability to changing climate conditions [40,41].

Cortisol concentrations, both in saliva [3,8,9,28,42] and plasma [5,18,43,44] have been extensively used to estimate the physiological stress response to exercise and different situations to which sport and recreational horses are regularly exposed. Thus, the relationship between cortisol and other physiological stress indicators has been studied. A direct relationship has been established between cortisol concentrations and blood lactic acid [45], heart rate, respiratory rate, rectal temperature [18], or eye temperature [46], all of them indicators of the intensity and effort of the exercise and therefore indicators of the physiological stress response.

In the present study, one hour of exercise significantly increased the salivary cortisol concentrations compared to the levels assessed at rest (S3 vs. S1, S4, S5). Following our results, we detected a mean increase of approximately 100% after 30 minutes of exercise (S2) but not significant compared to the pre-exercise values (S1). On the contrary, the obtained values at the end of the exercise (S3) showed a significant mean increase of approximately 240% compared to the pre-exercise values (S1). These findings are in line with other studies that exposed the horses to different types of exercise. Peeters et al. [9] described an increase of salivary cortisol concentrations by approximately 190%, comparing the baseline levels with the levels obtained during a show-jumping competition. Kedzierski et al. [5] showed an increase of 150% immediately after a short exercise of moderate intensity (800 m galloped distance), or Peeters et al. [47] revealed that salivary cortisol was 340% higher after a cross-country road event than just before the start.

Exercise-induced elevations in plasma cortisol concentrations have been well reported in horses [5,7,18,43,44] and therefore, the increase in plasma cortisol concentrations following the training session was expected. Other investigations have reported that plasma cortisol levels increase might reflect the exercise's duration, intensity, and stress level [14]. Horses participating in endurance [35], cross country events [47], or draught activities [48] showed, as well as seen in our study, increases in blood cortisol levels. Regarding our results, we detected an increase of approximately 75% right after the end of the exercise (B2) compared to the pre-exercise levels (B1). As mentioned above, the salivary cortisol concentrations increased 100% after 30 min of exercise and 240% after 60 min, a greater increase in salivary cortisol concentrations than in plasma. Steroids in the blood are mostly linked to corticosteroid-binding globulin (CBG), with a low percentage of cortisol remaining free and physiologically active [49]. After a stressful situation, the CBG becomes saturated, increasing the free fraction of circulating cortisol. Therefore, by passive diffusion, cortisol increases the salivary cortisol concentrations [30,49]. This would highlight the different magnitude increases detected between salivary and plasma cortisol concentrations in the evaluated stallions. Our results align with Kedzierski et al. [5], who stated an increase in salivary cortisol, approximately five times higher than the increase detected in the plasma right after race training. Overall, taking all the present results together demonstrates how the stallions' stress response following a training session to participate in the patronal festivals generates an activation of the HPA axis comparable to those generated in other common equestrian disciplines (e.g., dressage, race, or jumping courses). Additionally, the observed increases in cortisol concentrations, both in saliva and plasma, should also be related to the hormone's several supportive and advantageous physiological roles with the horse tolerance to the short-term exercise demands [14].

The recovery of the basal cortisol levels in horses has been reported to be variable in saliva and plasma and may depend on the stimulus to which the animal has been exposed. For example, the return to salivary cortisol basal values after transportation has been described to be, irrespective of the transport duration, two hours after the truck unloading [3] or between 30 min and one hour after a jumping course [9,11]. A decreasing but not significant tendency between the end and two hours post-training session (B2 vs. B3) was observed for plasma cortisol concentration. Opposite to the observed in the present paper, Casella et al. [18] described the recovery of plasma cortisol concentrations within the two hours after finishing a reining training session. For salivary cortisol, baseline levels were restored within the two hours after finishing the exercise. The present results demonstrate a faster resumption of baseline cortisol levels in saliva than in plasma. This finding would postulate the assessment of salivary cortisol levels as a better approach to monitor the recovery of cortisol concentrations after an exercise in horses since the biologically active fraction of the hormone is measured.

Hematological and cardiovascular adaptations are necessary for sport horses to ensure the oxygen and nutrient demands of the musculoskeletal system, as well as to eliminate metabolites produced in response to exercise and training [1]. Thus, hematological parameters would be subjected to the horses' age, sex, size, and weight [50]. In line with previous studies in horses [18,33,51,52], we observed how RBC, HGB, HCT, MCV, and MHC increased significantly at the end of the training session (B2) in comparison to pre-exercise values (B1). The activation of the sympathetic nervous system during exercise causes splenic contraction leading to an increase of the RBC, HGB, HCT, MCV, and MHC values because of the mobilization of the splenic reserve of RBCs [1,52]. Hence, the splenic contraction is associated with erythrocyte shift, leading to increased oxygen-carrying capacity [1,53]. The variations in WBC count, which occurs after any exercise, are frequently equated to the inflammatory response [33,54]. The increase in leucocytes seems not to be caused by the production of new cells but rather by an increase in lymphocytes, mainly from the spleen contraction [51,55]. The evaluated stallions did not show significant changes in WBC and LYM. This finding follows other results in horses [32,33,54], even Miglio et al. [33] found significant changes only in the differential white blood cell count during the initial training of thoroughbred racehorses. The horses enrolled in our study were healthy and habituated to the exercise performed, suggesting that the intensity, the stress reaction, and the general fitness of the horses might be relevant in the WBC variations during the training session [32,33,54]. Finally, no changes in PLT were detected, contrary to results presented by Miglio et al., Fazio et al., and Zobba et al. [33,55,56] in which a possible relation between exercise and platelet variation was described.

Similar to our results, Andriichuk and Tkachenko [51] did not find any apparent effect of exercise on PLT.

## **CONCLUSIONS**

This study evaluates for the first time the variations of salivary, plasma cortisol, and several hematological parameters to estimate the stress response in stallions following a preparatory training session to participate in the patronal festivals of Menorca. We have confirmed how cortisol concentrations in saliva and plasma increased significantly in stallions following one hour training session and decreased to baseline values within the two hours after finishing the activity for saliva, and within the twenty-four hours for plasma. Thus, monitoring the salivary cortisol levels would be a better approach to monitor the resumption of baseline cortisol concentrations after an exercise in horses. Additionally, we have observed how cortisol and hematological adaptations resemble other common equestrian disciplines. Overall, the present results provide a good basis for future research into the horses' physiological implications at the Menorca patronal festivals and other activities based on similar intensity and duration.

## REFERENCES

1. Hinchcliff, K.W.; Geor, R.J. *The horse as an athlete: a physiological overview*; First Edit.; Elsevier Ltd, 2008; ISBN 9780702028571.
2. Schmidt, A.; Hödl, S.; Möstl, E.; Aurich, J.; Müller, J.; Aurich, C. Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naive horses during repeated road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2010, 39, 205–213, doi:10.1016/j.domaniend.2010.06.002.
3. Schmidt, A.; Möstl, E.; Wehnert, C.; Aurich, J.; Müller, J.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* 2010, 57, 209–215, doi:10.1016/j.yhbeh.2009.11.003.
4. Bartolomé, E.; Cockram, M.S. Potential Effects of Stress on the Performance of Sport Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 40, 84–93, doi:10.1016/j.jevs.2016.01.016.
5. Kedziński, W.; Cywińska, A.; Strzelec, K.; Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* 2014, 85, 313–317, doi:10.1111/asj.12146.
6. Górecka-Bruzda, A.; Kosińska, I.; Jaworski, Z.; Jezierski, T.; Murphy, J. Conflict behavior in elite show jumping and dressage horses. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2015, 10, 137–146, doi:10.1016/j.jveb.2014.10.004.
7. Bohák, Z.; Harnos, A.; Joó, K.; Szenci, O.; Kovács, L. Anticipatory response before competition in Standardbred racehorses. *PLoS One* 2018, 13, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0201691.
8. Munk, R.; Jensen, R.B.; Palme, R.; Munksgaard, L.; Christensen, J.W. An exploratory study of competition scores and salivary cortisol concentrations in Warmblood horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2017, 61, 108–116, doi:10.1016/j.domaniend.2017.06.007.
9. Peeters, M.; Closson, C.; Beckers, J.F.; Vandenheede, M. Rider and Horse Salivary Cortisol Levels During Competition and Impact on Performance. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 155–160, doi:10.1016/j.jevs.2012.05.073.
10. Kang, O.D.; Yun, Y.M. Influence of horse and rider on stress during horse-riding lesson program. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2016, 29, 895–900, doi:10.5713/ajas.15.1068.
11. Ille, N.; Von Lewinski, M.; Erber, R.; Wulf, M.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Effects of the level of experience of horses and their riders on cortisol release, heart rate and heart-rate variability during a jumping course. *Anim. Welf.* 2013, 22, 457–465, doi:10.7120/09627286.22.4.457.



12. Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002, 23, 67–74, doi:10.1016/S0739-7240(02)00146-7.
13. Romero, L.M.; Butler, L.K. *Endocrinology of Stress*; 2007; Vol. 20;.
14. Ferlazzo, A.; Cravana, C.; Fazio, E.; Medica, P. The different hormonal system during exercise stress coping in horses. *Vet. World* 2020, 13, 847–859, doi:10.14202/vetworld.2020.847-859.
15. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
16. Palme, R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol. Behav.* 2019, 199, 229–243, doi:10.1016/j.physbeh.2018.11.021.
17. Hart, K.A.; Barton, M.H.; Ferguson, D.C.; Berghaus, R.; Slovis, N.M.; Heusner, G.L.; Hurley, D.J. Serum Free Cortisol Fraction in Healthy and Septic Neonatal Foals. 2011, 345–355.
18. Casella, S.; Vazzana, I.; Giudice, E.; Fazio, F.; Piccione, G. Relationship between serum cortisol levels and some physiological parameters following reining training session in horse. *Anim. Sci. J.* 2016, 87, 729–735, doi:10.1111/asj.12478.
19. Bohák, Z.; Szabó, F.; Beckers, J.F.; Melo de Sousa, N.; Kutasi, O.; Nagy, K.; Szenci, O. Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2013, 45, 38–42, doi:10.1016/j.domaniend.2013.04.001.
20. Fazio, E.; Medica, P.; Cravana, C.; Ferlazzo, A. Cortisol response to road transport stress in calm and nervous stallions. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013, 8, 231–237, doi:10.1016/j.jveb.2012.10.010.
21. Ralston, J.M.; STENHOUSE, A.M.; STENHOUSE, N.S.; BUCK, G.J.; LUCKS, S.F.; REYNOLDSON, J.A.; BOLTON, J.R. Cortisol concentrations in blood and urine of horses. *Aust. Vet. J.* 1988, 65, 1–5, doi:10.1111/j.1751-0813.1988.tb14919.x.
22. Gorgasser, I.; Tichy, A.; Palme, R. Faecal cortisol metabolites in quarter horses during initial training under field conditions. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 2007, 94, 226–230.
23. Fureix, C.; Benhajali, H.; Henry, S.; Bruchet, A.; Prunier, A.; Ezzaouia, M.; Coste, C.; Hausberger, M.; Palme, R.; Jegou, P. Plasma cortisol and faecal cortisol metabolites concentrations in stereotypic and non-stereotypic horses. *BMC Vet Res* 2013.
24. Comin, A.; Veronesi, M.C.; Montillo, M.; Faustini, M.; Valentini, S.; Cairoli, F.; Prandi, A. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in horse foals. *Vet. J.* 2012, 194, 131–132, doi:10.1016/j.tvjl.2012.04.006.

25. Gardela, J.; Carbajal, A.; Tallo-Parra, O.; Olvera-Maneu, S.; Álvarez-Rodríguez, M.; Jose-Cunilleras, E.; López-Béjar, M. Temporary Relocation during Rest Periods: Relocation Stress and Other Factors Influence Hair Cortisol Concentrations in Horses. *Animals* 2020, 10, 642, doi:10.3390/ani10040642.
26. Olvera-Maneu, S.; Carbajal, A.; Gardela, J.; Lopez-Bejar, M. Hair Cortisol, Testosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Their Ratios in Stallions as a Retrospective Measure of Hypothalamic–Pituitary–Adrenal and Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axes Activity: Exploring the Influence of Seasonality. *Animals* 2021, 11, 2202, doi:10.3390/ani11082202.
27. Christensen, J.W.; Beekmans, M.; Dalum, M. Van; Vandierendonck, M. Physiology & Behavior Effects of hyper flexion on acute stress responses in ridden dressage horses. *Physiol. Behav.* 2014, 128, 39–45, doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.024.
28. Contreras-Aguilar, M.D.; Henry, S.; Coste, C.; Tecles, F.; Escribano, D.; Cerón, J.J.; Hausberger, M. Changes in saliva analytes correlate with horses' behavioural reactions to an acute stressor: A pilot study. *Animals* 2019, 9, doi:10.3390/ani9110993.
29. Janczarek, I.; Wilk, I.; Stachurska, A.; Krakowski, L.; Liss, M. Cardiac activity and salivary cortisol concentration of leisure horses in response to the presence of an audience in the arena. *J. Vet. Behav.* 2019, 29, 31–39, doi:10.1016/j.jveb.2018.07.007.
30. Peeters, M.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Ledoux, D.; Vandenheede, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* 2011, 43, 487–493, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x.
31. König v. Borstel, U.; Visser, E.K.; Hall, C. Indicators of stress in equitation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 190, 43–56, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.018.
32. Soroko, M.; Śpitalniak-Bajerska, K.; Zaborski, D.; Poźniak, B.; Dudek, K.; Janczarek, I. Exercise-induced changes in skin temperature and blood parameters in horses. *Arch. Anim. Breed.* 2019, 62, 205–213, doi:10.5194/aab-62-205-2019.
33. Miglio, A.; Falcinelli, E.; Mezzasoma, A.M.; Cappelli, K.; Mecocci, S.; Gresele, P.; Antognoni, M.T. Effect of first long-term training on whole blood count and blood clotting parameters in thoroughbreds. *Animals* 2021, 11, 1–13, doi:10.3390/ani11020447.
34. Becker-Birck, M.; Schmidt, A.; Lasarzik, J.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013, 8, 87–94, doi:10.1016/j.jveb.2012.05.002.

35. Witkowska-Pilaszewicz, O.; Grzędzicka, J.; Seń, J.; Czopowicz, M.; Żmigrodzka, M.; Winnicka, A.; Cywińska, A.; Carter, C. Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. *Prev. Vet. Med.* 2021, 188, doi:10.1016/j.prevetmed.2021.105265.
36. Carroll, C.L.; Huntington, P.J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.* 1988, 20, 41–45, doi:10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x.
37. Buchanan, K.L.; Goldsmith, A.R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Anim. Behav.* 2004, 67, 183–185, doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.002.
38. Murphy, B.A. Circadian and Circannual Regulation in the Horse: Internal Timing in an Elite Athlete. *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 76, 14–24, doi:10.1016/j.jevs.2019.02.026.
39. Contreras-Aguilar, M.D.; Lamy, E.; Escribano, D.; Cerón, J.J.; Tecles, F.; Quiles, A.J.; Hevia, M.L. Changes in salivary analytes of horses due to circadian rhythm and season: A pilot study. *Animals* 2020, 10, 1–8, doi:10.3390/ani10091486.
40. Williams, R.J.; Marlin, D.J.; Smith, N.; Harris, R.C.; Haresign, W.; Davies Morel, M.C. Effects of cool and hot humid environmental conditions on neuroendocrine responses of horses to treadmill exercise. *Vet. J.* 2002, 164, 54–63, doi:10.1053/tvj.2002.0721.
41. Jeffcott, L.B.; Kohn, C.W. Contributions of equine exercise physiology research to the success of the 1996 Equestrian Olympic Games: a review. *Equine Vet. J. Suppl.* 1999, 30, 347–355, doi:10.1111/j.2042-3306.1999.tb05247.x.
42. Aurich, J.; Wulf, M.; Ille, N.; Erber, R.; von Lewinski, M.; Palme, R.; Aurich, C. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2015, 52, 11–16, doi:10.1016/j.domaniend.2015.01.003.
43. Piccione, G.; Casella, S.; Giannetto, C.; Messina, V.; Monteverde, V.; Caola, G.; Guttadauro, S. Haematological and haematochemical responses to training and competition in standardbred horses. *Comp. Clin. Path.* 2010, 19, 95–101, doi:10.1007/s00580-009-0902-z.
44. Gordon, M.E.; McKeever, K.H.; Betros, C.L.; Manso Filho, H.C. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. *Vet. J.* 2007, 173, 532–540, doi:10.1016/j.tvjl.2006.01.003.
45. Kędzierski, W.; Strzelec, K.; Cywińska, A.; Kowalik, S. Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 1106–1109, doi:10.1016/j.jevs.2013.04.011.

46. Yarnell, K.; Hall, C.; Billett, E. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiol. Behav.* 2013, 118, 32–39, doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.013.
47. Peeters, M.; Sulon, J.; Serteyn, D.; Vandenheede, M. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *J. Vet. Behav.* 2010, 5, 216, doi:10.1016/j.jveb.2009.10.043.
48. Kędzierski, W.; Pluta, M. The Welfare of Young Polish Konik Horses Subjected to Agricultural Workload. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2013, 16, 35–46, doi:10.1080/10888705.2013.740997.
49. Spencer, R.L.; Deak, T. A users guide to HPA axis research. *Physiol. Behav.* 2017, 178, 43–65, doi:10.1016/j.physbeh.2016.11.014.
50. Witkowska-Piłaszewicz, O.; Cywińska, A.; Michlik-Polczyńska, K.; Czopowicz, M.; Strzelec, K.; Biazik, A.; Parzeniecka-Jaworska, M.; Crisman, M.; Witkowski, L. Variations in haematological and biochemical parameters in healthy ponies. *BMC Vet. Res.* 2021, 17, 38, doi:10.1186/s12917-020-02741-5.
51. Andriichuk, A.; Tkachenko, H. Effect of gender and exercise on haematological and biochemical parameters in Holsteiner horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 2017, 101, e404–e413, doi:10.1111/jpn.12620.
52. Zobba, R.; Ardu, M.; Niccolini, S.; Cubeddu, F.; Dimauro, C.; Bonelli, P.; Dedola, C.; Visco, S.; Pinna Parpaglia, M.L. Physical, Hematological, and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2011, 31, 542–548, doi:10.1016/j.jevs.2011.03.010.
53. McKeever, K.H.; Hinchcliff, K.W.; Reed, S.M.; Hamlin, R.L. Splenectomy alters blood pressure response to incremental treadmill exercise in horses. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 1993, 265, R409–R413, doi:10.1152/ajpregu.1993.265.2.R409.
54. Fazio, F.; Assenza, A.; Tosto, F.; Casella, S.; Piccione, G.; Caola, G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds during training. *Vet. Rec.* 2010, 167, 370–372, doi:10.1136/vr.c3761.
55. Zobba, R.; Ardu, M.; Niccolini, S.; Cubeddu, F.; Dimauro, C.; Bonelli, P.; Dedola, C.; Visco, S.; Pinna Parpaglia, M.L. Physical, Hematological, and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2011, 31, 542–548, doi:10.1016/j.jevs.2011.03.010.
56. Fazio, E.; Medica, P.; Aveni, F.; Ferlazzo, A. The Potential Role of Training Sessions on the Temporal and Spatial Physiological Patterns in Young Friesian Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 47, 84–91, doi:10.1016/j.jevs.2016.07.009.



# CAPÍTOL III



# **Salivary Cortisol Variations to Estimate the Physiological Stress Response in Horses at Menorca Patronal Festivals.**

Sergi Olvera-Maneu<sup>1</sup>, Annaïs Carbajal<sup>1</sup>, Manel López-Béjar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Health and Anatomy, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences, 309 East Second Street, Pomona, CA 91766, USA



## ABSTRACT

In many countries, horses remain involved in traditional equestrian events such as those celebrated in Menorca (Spain), every year, since at least the XIV<sup>th</sup> century. The present study aimed to evaluate the variations of salivary cortisol concentrations to estimate the physiological stress response in horses at the Menorca patronal festivals. For this purpose, we assessed the salivary cortisol variations by enzyme immunoassay before, during, and after the festivals for three consecutive days. The first day, samples were taken before the start of the festivals (9-10 a.m.), and during the festivals (8-9 p.m.). The second day of the patronal festivals, the samples were taken on the morning (9-10 a.m.) and the afternoon (3-4 p.m.). On the third day, once the patronal festivals ended, the last batch of samples were collected at 8-9 p.m. Additionally, a control group was sampled two different days apart from the celebration at 8-9 a.m., 3-4 p.m., and 8-9 p.m. salivary cortisol concentrations from the control group did not show significant differences between sampling hours and the day of sampling ( $p > 0.05$ ). All the samples collected during the patronal festivals presented significantly higher cortisol levels in comparison to the control group and the sample collected before the start of the patronal festivals ( $p < 0.05$ ). Within the twenty-four hours after the end of the patronal festivals, cortisol concentrations returned to baseline levels and did not differ significantly from the control group ( $p > 0.05$ ). Results of the present study suggest that the evaluated traditional equestrian event triggers an acute stress response which the horses cope successfully and returns to baseline levels within 24h after the end of the event. Overall, the current work provides a basis for future research on the stress physiology of horses that take part in traditional celebrations or similar events.

## INTRODUCTION

In many countries, especially those from the Mediterranean region, equestrian celebrations, games, and tournaments with a religious or historical origin represent an alternative to the common use of horses [1]. In Menorca (Balearic Islands, Spain), every summer since at least the XIV<sup>th</sup> century, cavalry events are held in honor of the city's patron saint and are popularly known as patronal festivals or celebrations. Although the origin of these particular acts is unclear the main accepted hypothesis is that they started during the Medieval period and as a consequence of the creation of the commissions in charge of the churches. Those commissions had the purpose of collecting money to upkeep the ecclesiastic building and the collections were done by riding on horseback in pilgrimage through the town. At present, the main characters of the celebrations are the horses, and the most commonly used breed is the Menorca Purebred horse. This native horse breed is used to perform Classical and Menorca dressage, a distinctive type of dressage in which the horse practices exercises and movements similar to those performed during the patronal festivals [2]. The centuries-old celebrations have supported the maintenance and improvement of this native horse breed, and nowadays, there is a census of approximately 3000 animals, mainly located in Menorca. In the last few years, the social interest in the welfare of the participant horses has grown substantially since the animals must face potentially stressful situations during the acts. Therefore, evaluating their stress response may be the primary approach to the success in the horses' performance and well-being, as described in other common equestrian disciplines. [3].

The evaluation of the horses' stress response includes the assessment of behavioral and physiological indicators [4]. Cortisol, the final product released into the blood after the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), has lately become one of the most commonly assessed physiological indicators of the stress response, not only in horses but also in other species [5–7]. Different studies have reported a positive correlation between cortisol concentrations and heart rate, respiratory rate, rectal temperature [8], eye temperature [9] or blood lactic acid [10], all of them indicators of the intensity and effort of the exercise and therefore indicators of the physiological stress response in horses. Furthermore, cortisol has many supportive and advantageous physiological roles, including maintaining and restoring body homeostasis [6,7]. Thus, cortisol participates in the horses' tolerance and adaptation to the short-term exercise demands [7].

The measurement of blood cortisol in horses has long been the most common method for measuring cortisol concentrations, but recently, salivary cortisol analysis has become increasingly

popular to assess the adrenocortical response [5,11,12]. Salivary cortisol represents the biologically active form of the hormone [5,13], and a strong association between levels in blood and saliva has been described in horses. After an adrenocorticotropic hormonal challenge Peeters et al. [11] demonstrated that the horses' total blood cortisol concentrations might account for 80% of salivary cortisol concentrations and vice versa. Additionally, the salivary cortisol measurement offers a non-invasive and easy tool to perform a repeated and “non-disturbing” sampling for the animal [14,15], ideal in those situations where blood collection may be difficult or impossible to perform. Furthermore, compared to blood sampling, saliva collection does not require trained and qualified personnel to collect the samples [14,15]. The stress response of horses subjected to different exercises and sport activities such as competition [16–18], recreational activities [19–21] and training [22–24] has been well studied, including the measurement of salivary cortisol concentrations. Regarding horses used in traditional equestrian events, Pazzola et al. [1] explored the stress-related physiological changes in horses of *Sa Sartiglia* tournament (Sardinia, Italy), also celebrated since centuries ago and with some similarities with the Menorca celebrations. However, to date, no studies have been performed to determine the physiological stress responses of the horses that participate in the Menorca patronal festivals.

The present study aimed to evaluate the variations of salivary cortisol concentrations to estimate the stress response in stallions at the Menorca patronal festivals. For this purpose, we monitored the salivary cortisol variations before, during, and after the celebrations. We hypothesized that the horses' activity in the patronal festivals would produce an acute and transitory stress situation that would be reflected, among others, by an increase in the salivary cortisol concentrations during the celebration days and a decrease within the hours following the end of the events.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Patronal festivals**

Each year the September 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup>, more than a hundred stallions and their riders participate in the patronal festivals celebrated in honor of the Virgin of Grace in Maó (Menorca, Spain). The festivals are celebrated once a year and include different religious and popular events in the presence of thousands of people. During the celebration days, on September 7<sup>th</sup>, the horses start the performance at 4.00 p.m., until the midnight. Then the horses rest in their stables until the next day. On September 8<sup>th</sup>, the performance starts at 8.30 a.m. and ends around 4.00 p.m. Each day of celebration begins with a parade through the village on a pilgrimage to the church (Image 1.a) where the messes in honor of the city's patron saint are held. This is the first resting period of

the horses after the beginning of each day. The resting period for horses during the mess is variable (about 1.5h on September 7<sup>th</sup> and 2-2.5h on September 8<sup>th</sup>). Once the religious acts are ended, the horses head towards the village's main square, where the principal event, named "*jaleo*", is celebrated (Image 1.b). The "*jaleo*" consists of rearing up the horses performing the popular gait known as "*bol*" (walking courbette). This process is repeated three times per individual each day of celebrations and is commonly known as "jaleo round" and it must take less than 1.5min for authorities' recommendation. Between jaleo rounds, horses are resting for approximately 1-1.5h.



Image 1.a



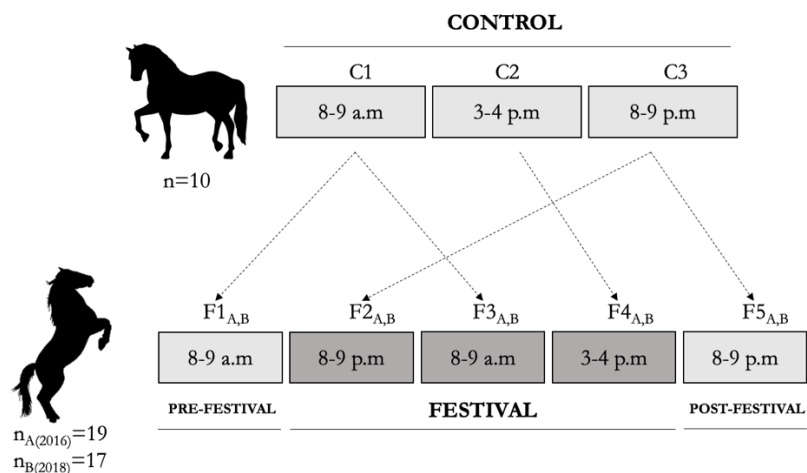
Image 1.b

**Image 1.** (a) Horses and riders in pilgrimage to the church (Maó, Menorca, Spain). Photo credits by Trevor Fryhatt. (b) Horse performing the "*bol*" in the middle of the villages' crowded main square during the *jaleo* round. Photo credits by Catalina Pasqual.

### **Animals, sampling, and ethics**

The design of the study was planned according to the different phases and necessities of the patronal festivals. Two different years of the celebrations were studied (2016 and 2018, named A and B respectively). Nineteen and seventeen Pure Breed Menorca stallions were included in the study for the 2016 and 2018 editions, respectively. Animals included in the study were regular participants in the festivals. All individuals were healthy and lacked any history of illness during the studied period. The body condition score (BCS) was evaluated using the 0 (emaciated) to 5

(extremely fat) BCS scale [25]. For all the stallions evaluated, the BCS was 3 (moderate to good body condition).



**Figure 1.** Schematical representation of the sampling timeline. Control samples were taken between 9-10 a.m. (C1), 3-4 p.m. (C2), and between 8-9 p.m. (C3). During patronal festivals samples were taken in the morning of the September 7<sup>th</sup> before the start of the festivals between 9-10 a.m. (F1) and during the festivals between 8-9 p.m. (F2). On the September 8<sup>th</sup> the samples were taken between 9-10 a.m. (F3) and 3-4 p.m. (F4). Finally, the last sample was collected the day after the festivals, on September 9<sup>th</sup> between 8-9 p.m. (F5). The same procedure was followed in both studied editions (2016 and 2018, named A and B respectively). Clear gray boxes represent non-active periods and dark gray boxes represent active periods.

Saliva was collected using sterile mounted swabs (Sugi®, Eschenburg, Germany) specially designed to absorb secretions, rubbing the cheeks mucosa and under the tongue for twenty seconds. Saliva was recovered from the swab placing it into a sterile syringe and pressing the plunger until the obtention of the maximum possible volume. Samples were stored under freezing at -20°C until assayed. We followed the timeline presented in Figure 1. The first sample was taken on the morning of September 7<sup>th</sup>, before the start of the festival, between 9-10 a.m. (F1). The following sample was collected between 8-9 p.m. (F2). On September 8<sup>th</sup> the samples were taken between 9-10 a.m. (F3) and between 3-4 p.m. (F4). Finally, the last sample was collected the day after the festival had ended, on September 9<sup>th</sup> between 8-9 p.m. (F5). The same protocol and timeline were followed on both studied editions. When the samples were collected before and after the celebrations (F1 and F5), the horses stayed at their own stables, while during the patronal festivals (F2, F3, and F4), the samples were collected in situ, trying to avoid the disturbance of the event. Additionally, we sampled a control group of ten stallions to set the salivary cortisol baseline

values between 9-10 a.m. (C1), 3-4 p.m. (C2), and 8-9 p.m. (C3). From the control group two replicates (one in August and another in September of 2019) were collected to avoid potential seasonal influence on salivary cortisol concentrations [26]. The sampling days in the control group were kept apart from any housing and handling related changes or disturbances. The sampling procedure followed was the same as the above mentioned. The samples C1 was used as a control for samples F1 and F3, C2 was used as a control for samples F4, and C3 was used as a control from samples F2 and F5 (Figure 1).

During the study, all animals were managed following the principles and guidelines of the Ethics Committee on Animal and Human Experimentation from the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain) and following the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. No other manipulation different from the salivary collection was performed. Additionally, informed consent from the horses' owners was obtained before the start of the study.

## **Cortisol quantification and biochemical validation of the enzyme immunoassay**

Enzyme immunoassay kit (Neogen Corporation©, Ayr, UK) was used to quantify salivary and plasma cortisol concentrations. According to the manufacturer, cross-reactivity of the EIA cortisol antibody with other steroids was: prednisolone 47.4%, cortisone 15.7%, 11-deoxycortisol 15.0%, prednisone 7.83%, corticosterone 4.81%, 6 $\beta$ -hydroxycortisol 1.37%, 17-hydroxyprogesterone 1.36%, deoxycorticosterone 0.94%. Steroids with a cross-reactivity <0.06% are not presented. Briefly, the criteria of precision, specificity, accuracy and sensitivity were followed to carry out the biochemical validation of the assays [27]. The precision was assessed by calculating the coefficients of variation from all duplicated analyzed samples. The specificity of the test was tested by calculating the linearity of the dilution using 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 dilutions of the salivary pool diluted with the EIA buffer provided by the kit. The accuracy was assessed through the spike-and-recovery test, calculated by adding to 100, 75 and 25  $\mu$ l of the pool, volumes of 25, 75 and 100  $\mu$ l of three cortisol concentrations provided by the EIA kit (0.2, 0.4 and 1 ng/ml). Finally, the sensitivity was given by the smallest cortisol concentration that the assay was able to detect and measure. For the present study inter-CV and intra-CV were 12.3% and 6.2% respectively. The complete results of the biochemical validation are reported in Chapter II.

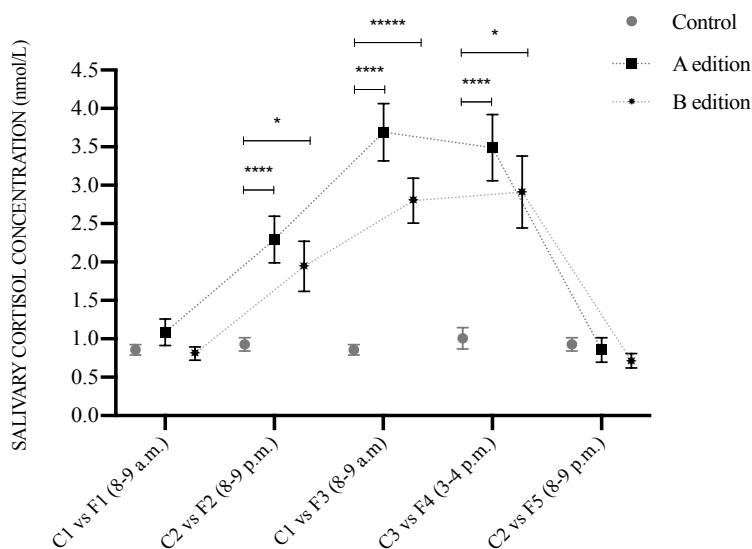
## **Statistical analysis**

Data were analyzed using RStudio software (R version 3.4.4) and, graphically represented, using GraphPad Prism software (version 8.0.2). Data is presented as mean  $\pm$  SEM unless otherwise stated. The significance level in all data was set at  $p < 0.05$ . The normality of the data was evaluated

using a Shapiro-Wilk test and salivary cortisol concentrations were  $\log_{10}$  transformed to achieve the normal distribution. To analyze the effect of the replicate and the sampling time in the salivary cortisol concentrations of the control group a Linear Mixed Effect model was used considering the sampling day (D1 or D2) and the sampling time (samples C1, C2, C3) as fixed factors and the individuals as random factor followed by an ANOVA performed on the fitted model. To evaluate the changes in salivary cortisol concentrations during the festivals a Linear Mixed Effect model setting the edition of the celebration (A and B) and the sampling time (samples F1<sub>A,B</sub>, F2<sub>A,B</sub>, F3<sub>A,B</sub>, F4<sub>A,B</sub>, F5<sub>A,B</sub>) as fixed factors and the individuals as random factor. An ANOVA was performed on the fitted model. Finally, a Dunnett's post hoc test was performed between the control and the patronal festival group. Sample C1 was compared with F1<sub>A,B</sub> and F3<sub>A,B</sub>, C2 was compared with F4<sub>A,B</sub> and finally, C3 was compared with F2<sub>A,B</sub> and F5<sub>A,B</sub>.

## RESULTS

### Salivary cortisol variations



**Figure 2.** Mean salivary cortisol concentrations (nmol/L)  $\pm$  SEM according to the sampling stage. Cx samples indicate the samples of the control group in comparison to the samples obtained the festival days (Fx). Upper asterisks indicate significant differences.

Changes in salivary cortisol concentrations for control group and participant horses are presented in Figure 2. Salivary cortisol concentration in the control group was not significantly influenced by the sampling day nor the sampling time ( $p > 0.05$ ). A significant effect of the sampling time ( $p$

< 0.05) on salivary cortisol concentrations was detected during the patronal festivals while no influence of the edition (A and B) was detected ( $p > 0.05$ ). The Dunnett's post hoc test revealed that samples collected during festivals were significantly higher in comparison to samples from the control group. Finally, within the twenty-four hours after the end of the celebrations F5 (8-9 p.m.), samples were not significantly different ( $p > 0.05$ ) compared to the samples C2 (8-9 p.m.) obtained from the control group.

## **DISCUSSION**

In the present study we aimed to evaluate the physiological stress response in horses participating at the Menorca patronal festivals by measuring the salivary cortisol variations. Therefore, we hypothesized that the participation of the horses at the celebrations would trigger an acute and transitory stress response that would be reflected by an increase of the salivary cortisol values during the festival days. The results of the present study corroborate our hypothesis and, for the first time, describes the generated physiological stress response in stallions involved in these centuries-old events.

To set the salivary cortisol baseline levels, we sampled a control group of ten stallions at three different times of the day [ 9-10 a.m. (C1), 3-4 p.m. (C2), and 8-9 p.m. (C3)] repeating the process two different days (one in August and another in September of 2019) to avoid potential sources of seasonal variations [28-30]. Baseline salivary cortisol concentrations detected in the present study showed similar values to other jumping and dressage horses [15,31]. Additionally, no significant effect of the day of sampling and the sampling time was detected. Results suggest the absence of circadian rhythm in the evaluated horses, contrary to what was reported in other investigations that described the existence of cortisol circadian rhythm in blood [22,32] and saliva [29,33]. A different study also failed to detect a circadian rhythm on salivary cortisol levels [34] possibly related, same as our study, with the sampling frequency. Several authors have suggested that changes in handling, habitat, generalized disease and intensive exercise can disturb the horses' cortisol circadian secretion pattern [26,35,36]. All above mentioned disturbing factors can be discarded in our study since during the sampling day, the horses of the control group were kept apart from any housing and handling-related changes or disturbances, and they were clinically healthy during the studied period. Hence, the absence of a circadian rhythm may not be driven by the management conditions. Increasing the number of samples and decreasing the sampling interval between samples could help us accurately detect the circadian variations, as performed in



other investigations [30,31]. Further research is needed to clarify the absence of circadian variations in the horses of the present study.

Different studies have shown how horses can anticipate a potentially stressful event like loading transport vehicles [37], race competitions in comparison to regular training [38], or trekking courses [39]. In the present study, the sample obtained the first day of festivals (F1<sub>A,B</sub>) did not differ significantly from the control sample collected at the same time of the day (C1). This finding suggests no anticipatory stress response of the horses evaluated in the present study, partially explained because while the samples were taken, the horses were not being manipulated or saddled up. In line with this finding, our previous study (presented in chapter II) showed similar results. No changes in blood and salivary cortisol were observed in horses that followed a training session to participate in the patronal festivals.

During the patronal festivals horses undergo an increase in physical activity. In exercised horses' salivary cortisol has been described to be a useful indicator of the stress level [15,40,41]. In the present study, salivary cortisol concentrations obtained during the festival days (F2<sub>A,B</sub>, F3<sub>A,B</sub>, F4<sub>A,B</sub>) were significantly higher than those obtained from the control group (C1, C2, C3). The observed increase in salivary cortisol concentration would be addressed to compensate the effects of the physical and environmental stressors to which the horses were exposed during those days (e.g., activity increase, crowded places, change of their habitual habitat, presence of other stallions, transport from their origin place to the town, and the music, between others). The results of the present study showed that cortisol concentrations increased in parallel to the duration of the festivals, suggesting that cortisol increases would be related to the duration and intensity of the exercise [7,40]. Salivary cortisol increases in comparison to the control group increased from ~100% on the first day of the celebrations to ~300% (edition A) and ~200% (edition B) on the morning of the second day. In addition, these results indicate that the evaluated horses showed a similar physiological stress response to the celebrations in both studied editions. The observed variations during the acts are comparable to results obtained by Kedzierski et al. [22], who showed an increase of ~150% immediately after a short exercise of moderate intensity (800 m galloped distance) in Arabian horses. Furthermore, Peeters et al. [17] showed that salivary cortisol was ~340% higher after a cross-country road than just before the start. Other studies have reported higher increases in cortisol concentrations than those observed in the present study, as for example the results reported by Schmidt et al. [37] who showed a salivary cortisol increase higher than 600% during road transport. Based on these studies, it is likely that both high and low-intensity exercise (long or short) induce a cortisol increase. However, most studies do not have an exact

measure of exercise intensity or a standardized time and frequency of post exercise cortisol measurements. Overall, the results of the present study suggest that the stress response generated during the festivals was not exceeding the stress response generated in other activities to which domestic horses are regularly exposed.

Throughout the year, the evaluated horses are trained to be in their best physical condition to ensure their successful performance and human safety during the celebration days. Results of the present study are aligned with results obtained in our previous study (chapter II), where an increase ~240% was detected after an hour of training preparatory to participate in the festivals. Therefore, the horses' regular and exhaustive training allows them to cope with the demands produced by the patronal festivals similarly as produced by training. Different reports have suggested that cortisol, the main glucocorticoid in horses, plays an essential role in metabolism and energy balance [42]. In medium-short-term action, cortisol acts as a catabolic hormone increasing lipolysis and fatty acid liberation [7,43]. Also, another consequence of cortisol increase is the stimulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis, increasing glycemia [7,44]. Hence, the disturbance of the horses' homeostasis produced by the exercise would be compensated by activating the HPA axis in order to maintain the homeostasis under stress conditions promoting the secretion of circulating hormones like cortisol [7].

Similar to the results obtained in our previous work (chapter II) salivary cortisol concentrations were highly variable between individuals specially during the days of the patronal festival. This finding follows other performed research on horses exposed to different types of exercise (e.g.: [1,11,17,18,20]). As suggested previously, individual variation could be related to the genetic conditioning of the horse [22], the interaction with their rider [18,45], and the experience of the evaluated animals.

Sample F5 did not show significant differences compared to the sample C3 of the control group. Thus, cortisol levels in horses that participated in the patronal festivals returned to baseline levels within the 24h following the event. The return to salivary cortisol baseline levels has been reported to differ depending on the stimulus the horse has been exposed to. For example, after an exogenous adrenocorticotrophic stimulation, salivary cortisol concentrations returned to baseline levels after 180 minutes, between 30 min and one h after a jumping course [15,46], or two h after unloading from the trailer, irrespective of the transport duration [47]. As reported in chapter II for the horses trained to participate in the patronal festivals, salivary cortisol reached baseline levels two hours after the end of the activity. The return to basal levels within 24h after the end of the

event suggests the restoration of the homeostatic balance and therefore the absence of a chronic stress situation produced by the use of these horses in the festivals.

## **CONCLUSIONS**

Overall, the current study provides a basis for future research on the stress physiology of horses that take part in traditional celebrations or similar events. For the first time, this study describes that the participation of the horses at the Menorca traditional celebrations generates an acute stress response reflected by a transitory salivary cortisol increase. We have shown how salivary cortisol concentrations increased progressively, reaching the maximal concentrations on the second day of the celebrations, and returning to the baseline levels within the day after the acts. We encourage future studies to investigate the long-term consequences on the health and welfare of the horses that participate in these types of events.

## REFERENCES

1. Pazzola, M.; Pira, E.; Sedda, G.; Vacca, G.M.; Cocco, R.; Sechi, S.; Bonelli, P.; Nicolussi, P. Responses of hematological parameters, beta-endorphin, cortisol, reactive oxygen metabolites, and biological antioxidant potential in horses participating in a traditional tournament<sup>1</sup>. *J. Anim. Sci.* 2015, 93, 1573–1580, doi:10.2527/jas.2014-8341.
2. Solé, M.; Gómez, M.D.; Galisteo, A.M.; Santos, R.; Valera, M. Kinematic Characterization of the Menorca Horse at the Walk and the Trot: Influence of Hind Limb Pastern Angle. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 726–732, doi:10.1016/j.jevs.2012.12.002.
3. Bartolomé, E.; Cockram, M.S. Potential Effects of Stress on the Performance of Sport Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 40, 84–93, doi:10.1016/j.jevs.2016.01.016.
4. Becker-Birck, M.; Schmidt, A.; Wulf, M.; Aurich, J.; von der Wense, A.; Möstl, E.; Berz, R.; Aurich, C. Cortisol release, heart rate and heart rate variability, and superficial body temperature, in horses lunged either with hyperflexion of the neck or with an extended head and neck position. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 2013, 97, 322–330, doi:10.1111/j.1439-0396.2012.01274.x.
5. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
6. Möstl, E.; Palme, R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002, 23, 67–74, doi:10.1016/S0739-7240(02)00146-7.
7. Ferlazzo, A.; Cravana, C.; Fazio, E.; Medica, P. The different hormonal system during exercise stress coping in horses. *Vet. World* 2020, 13, 847–859, doi:10.14202/vetworld.2020.847-859.
8. Casella, S.; Vazzana, I.; Giudice, E.; Fazio, F.; Piccione, G. Relationship between serum cortisol levels and some physiological parameters following reining training session in horse. *Anim. Sci. J.* 2016, 87, 729–735, doi:10.1111/asj.12478.
9. Yarnell, K.; Hall, C.; Billett, E. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiol. Behav.* 2013, 118, 32–39, doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.013.
10. Kędzierski, W.; Strzelec, K.; Cywińska, A.; Kowalik, S. Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 1106–1109, doi:10.1016/j.jevs.2013.04.011.

11. Peeters, M.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Ledoux, D.; Vandenheede, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* 2011, 43, 487–493, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x.
12. Waran, N.; Randle, H. What we can measure, we can manage: The importance of using robust welfare indicators in Equitation Science. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 190, 74–81, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.016.
13. Palme, R. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim. Welf.* 2012, 21, 331–337, doi:10.7120/09627286.21.3.331.
14. Contreras-Aguilar, M.D.; Hevia, M.L.; Escribano, D.; Lamy, E.; Tecles, F.; Cerón, J.J. Effect of food contamination and collection material in the measurement of biomarkers in saliva of horses. *Res. Vet. Sci.* 2020, 129, 90–95, doi:10.1016/j.rvsc.2020.01.006.
15. Peeters, M.; Closson, C.; Beckers, J.F.; Vandenheede, M. Rider and Horse Salivary Cortisol Levels During Competition and Impact on Performance. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 155–160, doi:10.1016/j.jevs.2012.05.073.
16. Christensen, J.W.; Beekmans, M.; van Dalum, M.; VanDierendonck, M. Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses. *Physiol. Behav.* 2014, 128, 39–45, doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.024.
17. Peeters, M.; Sulon, J.; Serteyn, D.; Vandenheede, M. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *J. Vet. Behav.* 2010, 5, 216, doi:10.1016/j.jveb.2009.10.043.
18. Strzelec, K.; Kedzierski, W.; Bereznowski, A.; Janczarek, I.; Bocian, K.; Radosz, M. Salivary cortisol levels in horses and their riders during three-day-events. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2013, 57, 237–241, doi:10.2478/bvip-2013-0042.
19. Długosz, B.; Próchniak, T.; Stefaniuk-Szmukier, M.; Basiaga, M.; Łuszczynski, J.; Pieszka, M. Assessment of changes in the saliva cortisol level of horses during different ways in recreational exploitation. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2020, 44, 757–762, doi:10.3906/vet-2003-57.
20. Strzelec, K.; Kankofer, M.; Pietrzak, S. Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. *Acta Vet. Brno* 2011, 80, 101–105, doi:10.2754/avb201180010101.
21. Kang, O.D.; Lee, W.S. Changes in salivary cortisol concentration in horses during different types of exercise. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2016, 29, 747–752, doi:10.5713/ajas.16.0009.

22. Kedzierski, W.; Cywińska, A.; Strzelec, K.; Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* 2014, 85, 313–317, doi:10.1111/asj.12146.
23. Witkowska-Pilaszewicz, O.; Grzędzicka, J.; Seń, J.; Czopowicz, M.; Żmigrodzka, M.; Winnicka, A.; Cywińska, A.; Carter, C. Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. *Prev. Vet. Med.* 2021, 188, doi:10.1016/j.prevetmed.2021.105265.
24. Schmidt, A.; Aurich, J.; Möstl, E.; Müller, J.; Aurich, C. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Horm. Behav.* 2010, 58, 628–636, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.011.
25. Carroll, C.L.; Huntington, P.J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.* 1988, 20, 41–45, doi:10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x.
26. Murphy, B.A. Circadian and Circannual Regulation in the Horse: Internal Timing in an Elite Athlete. *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 76, 14–24, doi:10.1016/j.jevs.2019.02.026.
27. Buchanan, K.L.; Goldsmith, A.R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Anim. Behav.* 2004, 67, 183–185, doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.002.
28. Olvera-Maneu, S.; Carbajal, A.; Gardela, J.; Lopez-Bejar, M. Hair Cortisol, Testosterone, Dehydroepiandrosterone Sulfate and Their Ratios in Stallions as a Retrospective Measure of Hypothalamic–Pituitary–Adrenal and Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axes Activity: Exploring the Influence of Seasonality. *Animals* 2021, 11, 2202, doi:10.3390/ani11082202.
29. Contreras-Aguilar, M.D.; Lamy, E.; Escribano, D.; Cerón, J.J.; Tecles, F.; Quiles, A.J.; Hevia, M.L. Changes in salivary analytes of horses due to circadian rhythm and season: A pilot study. *Animals* 2020, 10, 1–8, doi:10.3390/ani10091486.
30. Aurich, J.; Wulf, M.; Ille, N.; Erber, R.; von Lewinski, M.; Palme, R.; Aurich, C. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2015, 52, 11–16, doi:10.1016/j.domaniend.2015.01.003.
31. Smiet, E.; Van Dierendonck, M.C.; Sleutjens, J.; Menheere, P.P.C.A.; van Breda, E.; de Boer, D.; Back, W.; Wijnberg, I.D.; Van Der Kolk, J.H. Effect of different head and neck positions on behaviour, heart rate variability and cortisol levels in lunged Royal Dutch Sport horses. *Vet. J.* 2014, 202, 26–32, doi:10.1016/j.tvjl.2014.07.005.
32. Cordero, M.; Brorsen, B.W.; McFarlane, D. Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2012, 43, 317–324, doi:10.1016/j.domaniend.2012.05.005.

33. Bohák, Z.; Szabó, F.; Beckers, J.F.; Melo de Sousa, N.; Kutasi, O.; Nagy, K.; Szenci, O. Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2013, 45, 38–42, doi:10.1016/j.domaniend.2013.04.001.
34. Kolk, J.H. van der; Nachreiner, R.F.; Schott, H.C.; Refsal, K.R.; Zanella, A.J. Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 2010, 33, 211–213, doi:10.1111/j.2042-3306.2001.tb00604.x.
35. Irvine, C.H.G.; Alexander, S.L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1994, 11, 227–238, doi:10.1016/0739-7240(94)90030-2.
36. Lassourd, V.; Gayrard, V.; Laroute, V.; Alvinerie, M.; Benard, P.; Courtot, D.; Toutain, P.L. Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 1996, 271, R25–R33, doi:10.1152/ajpregu.1996.271.1.R25.
37. Schmidt, A.; Biau, S.; Möstl, E.; Becker-Birck, M.; Morillon, B.; Aurich, J.; Faure, J.M.; Aurich, C. Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2010, 38, 179–189, doi:10.1016/j.domaniend.2009.10.002.
38. Bohák, Z.; Harnos, A.; Joó, K.; Szenci, O.; Kovács, L. Anticipatory response before competition in Standardbred racehorses. *PLoS One* 2018, 13, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0201691.
39. Ono, A.; Matsuura, A.; Yamazaki, Y.; Sakai, W.; Watanabe, K.; Nakanowatari, T.; Kobayashi, H.; Irimajiri, M.; Hodate, K. Influence of riders' skill on plasma cortisol levels of horses walking on forest and field trekking courses. *Anim. Sci. J.* 2017, 88, 1629–1635, doi:10.1111/asj.12801.
40. Munk, R.; Jensen, R.B.; Palme, R.; Munksgaard, L.; Christensen, J.W. An exploratory study of competition scores and salivary cortisol concentrations in Warmblood horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2017, 61, 108–116, doi:10.1016/j.domaniend.2017.06.007.
41. Christensen, J.W.; Beekmans, M.; Dalum, M. Van; Vandierendonck, M. Physiology & Behavior Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses. *Physiol. Behav.* 2014, 128, 39–45, doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.024.
42. Viru, A.; Viru, M. Cortisol - Essential Adaptation Hormone in Exercise. *Int. J. Sports Med.* 2004, 25, 461–464, doi:10.1055/s-2004-821068.
43. Peckett, A.J.; Wright, D.C.; Riddell, M.C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism.* 2011, 60, 1500–1510, doi:10.1016/j.metabol.2011.06.012.
44. Rabasa, C.; Dickson, S.L. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2016, 9, 71–77, doi:10.1016/j.cobeha.2016.01.011.

45. von Lewinski, M.; Biau, S.; Erber, R.; Ille, N.; Aurich, J.; Faure, J.-M.; Möstl, E.; Aurich, C. Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: Different responses to training and performance. *Vet. J.* 2013, 197, 229–232, doi:10.1016/j.tvjl.2012.12.025.
46. Ille, N.; Von Lewinski, M.; Erber, R.; Wulf, M.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Effects of the level of experience of horses and their riders on cortisol release, heart rate and heart-rate variability during a jumping course. *Anim. Welf.* 2013, 22, 457–465, doi:10.7120/09627286.22.4.457.
47. Schmidt, A.; Möstl, E.; Wehnert, C.; Aurich, J.; Müller, J.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* 2010, 57, 209–215, doi:10.1016/j.yhbeh.2009.11.003.





# CAPÍTOL IV



# **Protocol d'Avaluació del Benestar dels Cavalls Participants en les Festes Patronals de Menorca**

Sergi Olvera-Maneu<sup>1</sup>, Eduard José-Cunilleras<sup>2</sup>, Xavier Manteca<sup>3</sup>, Manel López-Béjar<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra  
(Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Espanya

<sup>2</sup>Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra  
(Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Espanya

<sup>3</sup>Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra  
(Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Espanya

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences, 309 East Second Street,  
Pomona, CA 91766, USA

## INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

El concepte de benestar animal ha estat tema de discussió durant les últimes dècades degut fonamentalment al fet que comprèn la ciència, ètica, economia i política [1,2]. El benestar animal sorgeix del convenciment que els animals són éssers amb sentiments, que experimenten dolor i altres formes de patiment o estrès i que fer patir a un animal no és moralment acceptable. Així doncs, el benestar animal no s'oposa categòricament a l'ús de l'animal per part de les persones, però sí que implica un compromís per a assegurar una bona qualitat de vida durant tot el cicle vital de l'animal, des del naixement fins a la mort [3,4].

La relació de les persones amb els cavalls es remunta a la seva domesticació i aquests han exercit una sèrie de funcions vitals en les societats com les relacionades amb el transport, el treball, la religió, el servei militar, l'alimentació o els esports [5]. Així doncs de l'ús dels animals per part de les persones se'n deriven una sèrie de potencials problemes relacionats amb el benestar animal i que la ciència s'ha encarregat (i s'encarrega) de caracteritzar, avaluar i si és necessari, millorar. Amb la motivació i la recerca de noves formes d'avaluar el benestar dels animals, de granja principalment, entre el 2004 i el 2009 la Unió Europea va finançar el projecte *Welfare Quality*® [6] i que es va encarregar de l'elaboració de protocols d'avaluació de benestar animal.

En la majoria de casos el maneig dels cavalls és individualitzat i actualment en els països desenvolupats s'utilitzen per activitats recreatives i l'esport [7], la qual cosa fa que algunes de les mesures aplicades en els protocols per a animals de granja siguin poc útils per l'avaluació dels cavalls destinats a l'oci o activitats recreatives i esportives. D'aquesta manera es requereix l'aplicació d'altres indicadors adaptats a la realitat de l'animal i la situació que es pretén avaluar. Actualment existeixen diversos protocols per l'avaluació del benestar dels cavalls com per exemple l'*Australian Welfare Protocol* [8], el *Welfare monitoring System -Assessment Protocol for Horses* [9], l'*AWIN welfare assessment protocol for horses* [10], desenvolupat en el context del 7è Marc Europeu de Recerca i Innovació, o el *Horse Welfare Assessment Protocol (HWAP)* [7].

La regulació normativa de les festes patronals de Menorca ve determinada pels seus protocols i les ordenances municipals i fins el dia d'avui no existeix cap normativa relacionada amb el benestar i la salut dels cavalls que hi participen. L'interès generalitzat de la societat en el benestar animal i la necessitat de garantir el benestar dels animals en activitats ludicofestives, com les celebrades a Menorca, ha incentivat la realització d'aquest estudi i que té l'objectiu de dissenyar, adaptar i aplicar un protocol d'avaluació del benestar dels cavalls participats en les festes patronals de Menorca.

# PROTOCOL D'AVALUACIÓ DEL BENESTAR DELS CAVALLS PARTICIPANTS EN LES FESTES PATRONALS DE MNEORCA

## IDENTIFICACIÓ DELS POSSIBLES PROBLEMES RELACIONATS AMB EL BENESTAR DELS CAVALLS DURANT LES FESTES PATRONALS DE MENORCA

- Que el cavall tingui un problema de salut que li causi dolor o li dificulti realitzar l'activitat que se li demana durant la festa; ja sigui previ a les celebracions o provocat per aquestes.
- Que el cavall tingui una condició corporal inadequada que indiqui un problema de salut que li dificulti realitzar l'activitat que se li demana durant la festa.
- Que l'animal no disposi d'abeuradors suficients, nets i amb aigua corrent i això suposi un inconvenient per la seva correcta hidratació.
- Que el cavall no hagi sigut entrenat prèviament de manera correcta i pugui ocasionar un problema de salut o estrès.
- Que l'animal pateixi una situació d'estrès excessiva deguda al transport, sorolls, presència d'altres animals, persones, comportament inadequat del genet, mal maneig o ús dels elements de càstig, o el clima.
- Que el recorregut que realitza la colcada no estigui en bones condicions en tots els seus trams i l'animal pugui relliscar i lesionar-se.

## DISSENY DEL PROTOCOL

Per la creació del present protocol es va realitzar una adaptació dels protocols prèviament validats per l'avaluació del benestar de cavalls destinats a activitats recreatives i esportives [7,10] i que es basen en els criteris i principis de benestar proposats pel projecte *Welfare Quality*® per tal de garantir un enfocament holístic que compregui les diferents dimensions del benestar animal. Tots els indicadors van ser discutits prèviament pel grup d'experts encarregat de l'elaboració del present document i que compten amb una àmplia experiència en el camp de la salut i el benestar en cavalls. Cada indicador es va discutir en termes de: i) rellevància per al benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca; ii) viabilitat de ser mesurada in situ; iii) el criteri *Welfare Quality*® en el qual hauria d'incloure's; i iv) com i quan mesurar-lo (A: abans; D: Durant; Ds; Després de les celebracions). Finalment, en el protocol proposat per l'avaluació del benestar dels cavalls

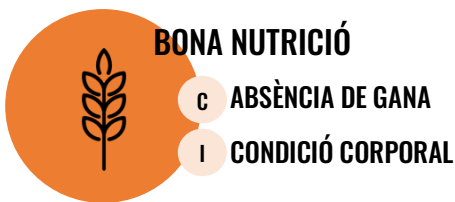
participants en les festes patronals de Menorca es van incloure 4 principis, 8 criteris i 16 indicadors (Taula 1).

L'element fonamental en què es basa l'aplicació del present protocol és amb la creació d'una comissió responsable que s'encarregarà de vetllar pel benestar dels cavalls abans, durant i després de les festes patronals de Menorca i que estarà integrada per:

- Equip veterinari experimentat en clínica de cavalls i/o benestar animal.
- Un membre de la Junta de Caixers.
- Un membre designat de l'ajuntament.

PRINCIPI	CRITERI	INDICADOR
BONA NUTRICIÓ	ABSÈNCIA DE GANA	CONDICIÓ CORPORAL
	ABSÈNCIA DE SET PROLONGADA	DISPONIBILITAT D'AIGUA
BONA ESTABULACIÓ I DESCANS	ESTABULACIÓ	DIMENSIONS DEL BOX I QUALITAT DEL JAÇ
	CONFORT TÈRMIC	ZONES D'OMBRA DURANT ELS DESCANSOS
BONA SALUT	ABSÈNCIA DE LESIONS	COIXESA
		INFLAMACIONS ARTICULARS
		ALTERACIONS A LA PELL
		SIGNES DE FALTA DE CURA DELS CASCS
	ABSÈNCIA DE MALALTIES RELACIONADES AMB L'ESFORÇ O ALTRES	DOLOR ABDOMINAL, DIARREA
		DESHIDRATACIÓ I/O COP DE CALOR
		RABDOMIÒLISI
		SECRECIÓ NASAL / TOS
		LAMINITIS
	ABSÈNCIA DE DESCONFORT I LESIONS INDUÏDES PEL MANEIG	LESIONS PER ELEMENT DE CÀSTIG
LESIONS PER MUNTURA I EMBOCADURA		
COMPORTAMENT APROPIAT	ABSÈNCIA ESTAT EMOCIONAL NEGATIU	AVALUACIÓ QUALITATIVA DEL COMPORTAMENT

**Taula 1.** Estructura del protocol proposat per avaluar el benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca. La primera columna determina els principis de benestar animal. La segona columna especifica els criteris a avaluar i a la tercera els indicadors per valorar els criteris.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

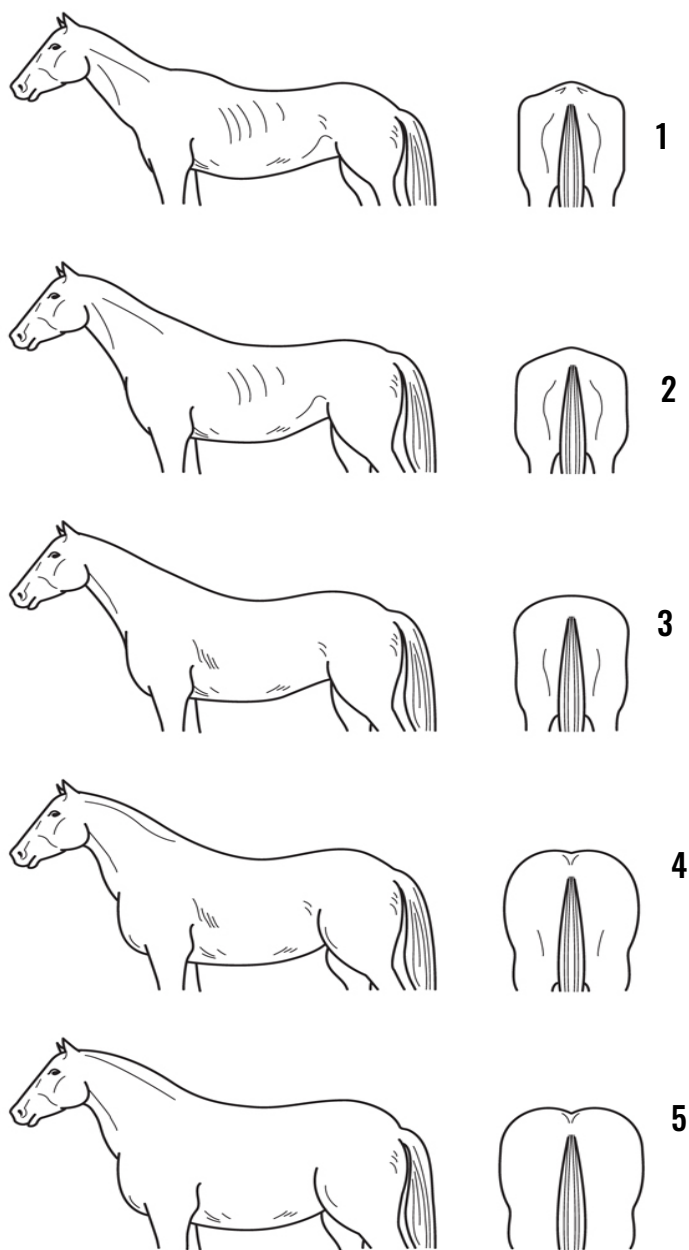
Per a la puntuació de la condició corporal s'utilitza un mètode estandarditzat que avalua la quantitat de greix de l'animal mitjançant una escala de l'1 al 5 proposada per Carroll & Huntintong [11]. La condició corporal pot variar per molts factors, com per exemple, l'alimentació i la disponibilitat de menjar, les activitats reproductives, la climatologia, l'entrenament o activitats de treball i la presència de paràsits, problemes dentals i/o malalties [10].

PUNTUACIÓ	COLL	DORS I COSTELLES	PELVIS
1	Estret i flux a la base	Costelles fàcilment visibles, columna vertebral prominent amb la pell enfonsada a banda i banda	Pelvis i gropa prominents, gropa enfonsada però amb pell flexible, cavitat profunda sota la cua
2	Estret i ferm	Costelles poc visibles, columna vertebral poc visible però palpable	Gropa plana a banda i banda de la columna vertebral, gropa ben definida, una mica de greix, lleugera cavitat sota la cua
3	Ferm	Costelles i columna vertebral poc cobertes de greix i palpables	Gropa plana i parcialment coberta de greix. Pelvis palpable
4	Ample i ferm	Costelles ben cobertes i lleugera dificultat per palpar-les	Pelvis coberta de greix cobertes i lleugera dificultat per palpar-la
5	Cresta Marcada, molt ample i ferm	Costelles ocultes i que no es poden palpar. Esquena ample i plana.	Pell llisa i poc flexible amb la pelvis completament coberta de greix i molt difícil de palpar

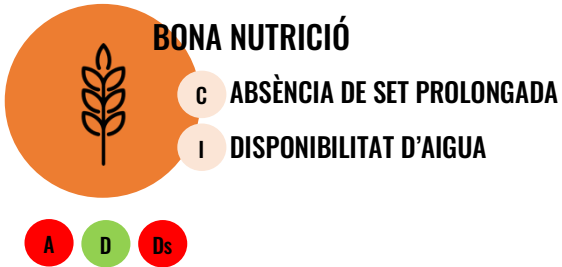
## ACCIÓ

Si l'animal es troba en una condició corporal inadequada (igual o inferior a 2, o 5) el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.





**Imatge 1.** Representació gràfica de la puntuació de la condició corporal dels cavalls proposada per Carroll & Huntintong [11]. Adaptat de: Welfare monitoring System. Assessment protocol for horses (Wageningen UR Livestock Research) [9].



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

Avaluar la disponibilitat d'aigua significa no sols comprovar la presència de punts d'aigua, sinó també avaluar el seu funcionament i neteja. L'aigua és essencial per a la vida; cada animal ha de tenir accés a un punt d'aigua [10]. Els cavalls han d'estar completament hidratats per a ajudar a prevenir el desenvolupament de problemes de salut i benestar. És important que hi hagi aigua corrent i no quedi estancada per evitar el risc de possibles contagis.

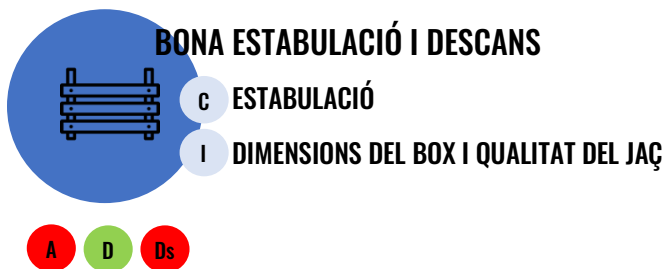
Comprovar:

1. La presència d'aigua.
2. El funcionament de l'aigua corrent.
3. La netedat.
4. La potabilitat.

Es recomana que hi hagi un abeurador que compleixi les característiques esmentades anteriorment per cada 10 individus.

## ACCIÓ

El membre de l'ajuntament designat de la comissió de benestar animal s'encarregarà de vetllar per la presència d'aigua corrent, potable i neta en tots els punts d'abeurament prèviament establerts. Si no es compleix algun dels punts esmentats anteriorment es procedirà a solucionar l'inconvenient.



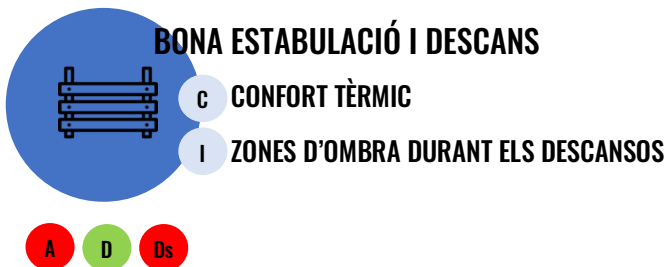
## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

En certes ocasions els cavalls participants en les festes patronals es traslladen d'un estable a un altre durant les festes. En aquest cas, és important que les condicions dels estables en que s'allotgen els animals durant el període de les festes siguin les adients. Entre els aspectes més importants a tenir en compte es troben la mida del box i el jaç.

1. La mida recomanada del box varia segons l'alçada del cavall: així, per cavalls d'una alçada de 150-160 cm a la creu es recomana una superfície mínima de 9 m<sup>2</sup>, mentre que per cavalls que tinguin una alçada de 160-170 cm a la creu es recomana una superfície de 10-11 m<sup>2</sup> [10].
2. Un altre aspecte a tenir en compte és que tota la superfície del box ha de tenir jaç de qualitat, és a dir, sec, net i que desprengui la mínima quantitat possible de pols [10].

## ACCIÓ

Es comunicarà a la comissió designada pel benestar dels cavalls participants en les festes patronals si algun dels animals que hi participen romandrà durant els dies de la festa estabulat en un lloc diferent a l'habitual. De ser així l'estable temporal haurà de complir amb els requeriments esmentats prèviament.



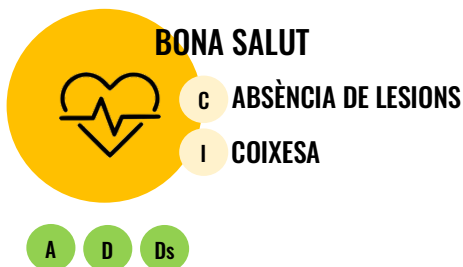
## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

L'estrès tèrmic és comú en els èquids entrenats o exercitats en ambients càlids i humits [12] com els que es presenten durant les festes patronals i que són causa potencial de l'aparició d'afectacions en la salut derivades per l'esforç. Especialment aquest punt és important durant els descansos mentre els caixers i cavallers celebren les completes i la missa i els moments en què genets i cavalls esperen per entrar al jaleo.

Els elements que poden indicar estrès tèrmic inclouen un augment de la freqüència respiratòria, fosses nasals eixamplades, moviments de cap incrementats i absència de resposta cap a l'entorn, també es pot observar una sudoració excessiva i hipertèrmia, entre d'altres.

## ACCIÓ

Per part de l'administració competent s'haurà de garantir la presència de zones d'ombra prou extenses com perquè els cavalls no es molestin entre ells durant els períodes de descans i, a més, es recomana que n'hi hagi més d'una per tal que els cavalls que no són compatibles entre ells es puguin separar.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

La coixesa ve definida per un moviment anormal que es fa més evident durant la marxa. Aquesta afecció redueix la capacitat del cavall per utilitzar una o més potes de manera normal. En molts casos redueix la mobilitat dels cavalls que poden arribar a ser incapaços d'aguantar el seu propi pes sobre la pota, o potes, afectades. La condició d'estar coix produeix malestar i dolor, i pot ser conseqüència de moltes afeccions clíniques diferents [10,13].

Per valorar la presència de coixesa el veterinari realitzarà un examen de coixesa habitual:

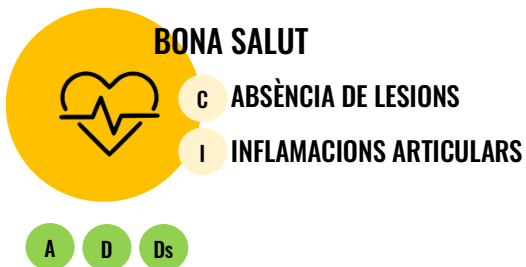
1. Abans de l'inici de les celebracions.
2. Durant la celebració de les festes patronals, ja sigui a demanda per part del genet o per indicació del propi veterinari.
3. Un cop acabades les celebracions.

Les coixeses poden ser de diferent grau [13]:

- 0: No hi ha coixesa
- 1: Coixesa difícil de veure i només observable al trot, cercles, etc.
- 2: Coixesa difícil de veure al pas o al trot en línia recta, però consistent al trot o en determinades circumstàncies (cercles o superfície dura)
- 3: Coixesa consistent i observable al trot en totes les circumstàncies
- 4: Coixesa evident al pas
- 5: Recolzament mínim de l'extremitat en moviment o en repòs, o incapacitat total de recolzament

## ACCIÓ

1. Si es detecta la presència de coixesa d'un grau igual o superior a 3 prèvia o durant les festes patronals el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.
2. Si es detecta la presència de coixesa al finalitzar les festes patronals el veterinari designat indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

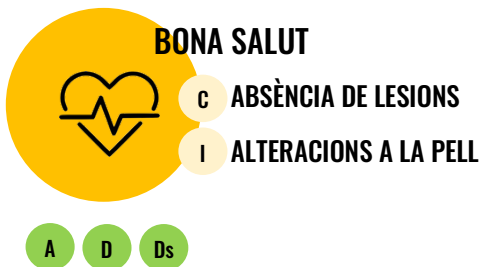
Quan hi ha augment del fluid en els teixits que envolten una articulació es produeix una inflamació de l'articulació. Aquesta inflamació pot ser dolorosa i indicativa d'algunes alteracions com per exemple, artritis, lesions, infeccions o fractures òssies [10].

Per valorar la presència o absència d'inflamacions articulars el veterinari designat realitzarà una inspecció visual de:

1. Colze
2. Genoll
3. Garreta
4. Garró
5. Greixet

## ACCIÓ

Si es detecta la presència d'inflacions articulars que causin dolor o dificultat de realitzar l'activitat que se li demana al cavall durant la festa, el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

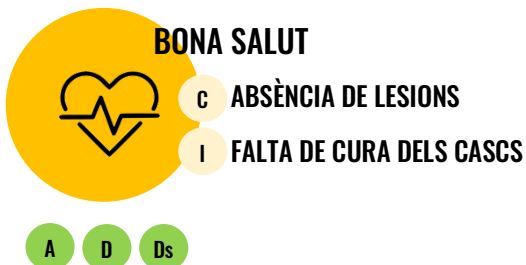
Es consideren alteracions de la pell les zones sense pèl, les cicatrius, les ferides i les inflamacions. Algunes de les diverses raons per les que aquestes alteracions poden estar presents en l'animal són: cops, tipus i qualitat del material que s'utilitza per entrenar o treballar, quantitat i intensitat de treball, baralles amb altres cavalls i malalties [10].

Per valorar la presència d'alteracions a la pell el veterinari designat realitzarà una inspecció visual on s'haurà de determinar:

1. Tipus d'alteració
2. Mida de l'alteració
3. Gravetat de l'alteració

## ACCIÓ

Si es detecta la presència d'alteracions a la pell especialment de mida i gravetat considerable el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

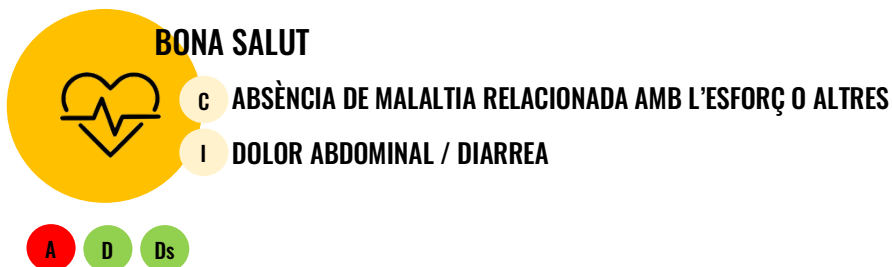
El sobrecreixement i el mal maneig dels cascs, com el no ser retallats regularment o estar mal retallats, són signes de falta de cura dels cascs. Així mateix, aquesta condició pot ser una font de dolor per l'animal [10].

Per valorar la presència de signes de falta de cura dels cascs el veterinari realitzarà una inspecció visual dels quatre cascs de l'animal abans de l'inici de les celebracions.

## ACCIÓ

Si es detecten alteracions que puguin causar dolor a l'animal el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau. A més es recomana la utilització de ferradures de goma per evitar rellicades.





## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

El dolor abdominal (còlic) en el cavall es pot manifestar amb símptomes variables segons la intensitat del dolor [14,15]. Són signes de dolor abdominal (de menor a major intensitat): deixar de menjar, apatia, mirar-se als flancs, tombar-se i aixecar-se repetidament, rascar de forma persistent amb les extremitats anteriors (mans), donar-se coces a l'abdomen, tombar-se i rebolcar-se repetidament.

La diarrea en cavalls és l'augment de la freqüència de defecació i la presència de femtes pastoses o líquides. S'ha de tenir en compte que un cavall nerviós o excitat pot passar femtes toves (com una vaca) de forma ocasional [14,15].

Per valorar la presència i gravetat del còlic o la diarrea el veterinari realitzarà una exploració física general, que pot incloure o no altres procediments (palpació rectal, intubació nasogàstrica o altres).

## ACCIÓ

Si es detecten signes compatibles amb dolor abdominal (còlic) o diarrea líquida, el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## BONA SALUT

C

ABSÈNCIA DE MALALTIA RELACIONADA AMB L'ESFORÇ O ALTRES

I

DESHIDRATACIÓ I/O COP DE CALOR



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

La deshidratació en cavalls associada o no a l'esforç és la pèrdua significativa de fluids corporals (aigua i electrolits), generalment associada a la sudoració o pèrdues gastrointestinals [12].

Per valorar la presència i gravetat de la deshidratació i/o cop de calor el veterinari realitzarà una exploració física general.

Signes que indiquen la necessitat d'atenció veterinària [12,16]:

- Sudoració profusa, respiració agitada.
- Temperatura rectal:  $>41-42^{\circ}\text{C}$  (Una temperatura rectal de més de  $42^{\circ}\text{C}$  indica la necessitat immediata de refredament corporal i la interrupció de l'exercici).
- Freqüència cardíaca elevada:  $>60-80$  bpm.
- Freqüència respiratòria elevada:  $>80-100$  rpm.
- Disminució de l'elasticitat de la pell.
- Temps de reompliment capil·lar:  $>2\text{s}$ .
- Mucoses seques.
- Orina fosca (pigmentúria associada a rabdomiòlisis).
- Marxa rígida, reticència a moure's (signe de miositis).

## ACCIÓ

Si es detecten signes compatibles amb deshidratació i/o cop de calor, el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau. Cal destacar que la deshidratació i cop de calor son urgències que cal atendre de forma ràpida per a reduir el risc de complicacions greus posteriors.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

La rabdomiòlisi (miositis o azotúria) en cavalls associada o no a l'esforç és la inflamació i trencament microscòpic de les fibres musculars dels principals grups musculars (glutis, musculatura del dors i altres). Es manifesta com a rigidesa i dolor a la palpació dels grups musculars afectats, i una marxa que pot ser rígida al pas. En alguns cavalls els signes de dolor es poden confondre amb un còlic lleu [16,17].

Per valorar la presència i gravetat de la rabdomiòlisi el veterinarí realitzarà una exploració física general.

Signes que indiquen la necessitat d'atenció veterinària [16,17]:

- Marxa rígida, reticència a moure's (signe de miositis).
- Orina fosca (pigmentúria associada a rabdomiòlisi).
- Freqüència cardíaca elevada: >60-80 bpm.

## ACCIÓ

Si es detecten signes compatibles amb rabdomiòlisi, el veterinarí designat indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## BONA SALUT

**C** ABSÈNCIA DE MALALTIA RELACIONADA AMB L'ESFORÇ O ALTRES

**I** SECRECIONS/TOS



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

Les descàrregues nasals, oculars o penianes poden ser un símptoma de la presència d'una malaltia localitzada o generalitzada [10].

Els cavalls poden tenir tos per malalties víriques, infeccions bacterianes o processos al·lèrgics, tant de les vies respiratòries altes com a nivell toràcic o pulmonar.

1. Per valorar la presència de secrecions el veterinarí designat realitzarà una inspecció visual dels orificis nasals, ulls i penis.
2. Per valorar la presència de tos el veterinarí realitzarà una inspecció visual i exploració física per detectar-la i per descartar la presència de sorolls respiratoris afegits a la auscultació.

## ACCIÓ

1. Si amb la inspecció visual es detecta la presència de secrecions nasals, oculars o penianes, que impliquin un risc sanitari potencial pel propi animal o els altres participants, el veterinarí designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.
2. Si es detecten tos freqüent o alteracions de la auscultació respiratòria, que impliquin un risc sanitari potencial pel propi animal o els altres participants, el veterinarí designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

La laminitis és la inflamació i/o degeneració dels teixits que connecten els cascs amb la tercera falange. A causa d'aquesta inflamació entre les estructures còrnies (casc) i les òssies, el cavall pateix dolor i rigidesa en caminar, especialment en cercles. La laminitis pot ser conseqüència d'un sobre esforç o impacte excessiu sobre terrenys durs, a causa de la deshidratació greu i/o cop de calor, o per alguns tipus de còlic. El cavall pot presentar una postura amb les potes anteriors (mans) més avançades, i les potes posteriors (peus) per sota de l'abdomen. Pot presentar dolor sols a les potes anteriors o a totes quatre [18].

Per valorar la presència i gravetat de la laminitis el veterinari realitzarà una exploració física general i/o examen de coixesa.

Signes que indiquen la necessitat d'atenció veterinària [18]:

- Marxa rígida, reticència a moure's, especialment en cercles.
- Cascs calents a la palpació i/o pols digital elevat.
- Dolor a la zona de les pinces del casc quan apliquem pressió amb pinces/tenalles de casc.
- Freqüència cardíaca elevada: >60-80 bpm.

## ACCIÓ

Si es detecten signes compatibles amb rabdomiòlisi, el veterinari designat indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## BONA SALUT

**C** ABSÈNCIA DE LESIONS INDUÏDES PER MANEIG

**I** LESIONS PER ELEMENT DE CàSTIG



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

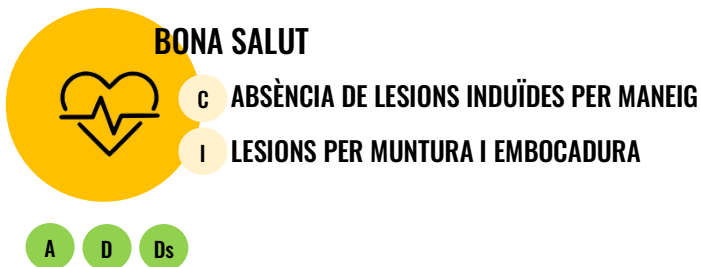
Es consideren lesions per elements de càstig aquelles lesions infringides pel genet amb elements com els esperons o la serreta. Les lesions que aquests elements poden provocar poden arribar a ser doloroses i comportar un problema de benestar.

Per valorar la presència de lesions induïdes per elements de càstig el veterinari designat realitzarà una inspecció visual on s'haurà de determinar:

1. Presència o absència de lesions induïdes per la serreta a la zona en qüestió.
2. Presència o absència de lesions induïdes pels esperons a les zones en qüestió.

## ACCIÓ

Si es detecta la presència de lesions induïdes pel genet amb els esperons o la serreta de mida i gravetat considerable, el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau. A més es recomana que els genets no utilitzin ni serreta ni esperons molt agressius com són els de pastisset o similars.



## DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

Es consideren lesions per muntures i embocadures aquelles derivades de l'ús dels estris de munta com la sella i complements o el mos i les regnes [10].

Per valorar la presència de lesions induïdes per un ús inapropiat dels estris de munta, el veterinari designat realitzarà una inspecció visual on s'haurà de determinar:

1. Presència o absència de lesions induïdes per la sella, especialment a la zona del llom i propera a la creu.
2. Presència o absència de lesions a les commissures labials induïdes pel mos.

## ACCIÓ

Si es detecta la presència de lesions induïdes per un ús inapropiat dels estris de munta com la sella i complements o el mos i les regnes el veterinari designat comunicarà les seves troballes al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar de la colcada i s'indicarà el tractament a seguir, si s'escau.



## COMPORAMENT APROPIAT

C ABSÈNCIA ESTAT EMOCIONAL NEGATIU

I AVALUACIÓ QUALITATIVA DEL COMPORAMENT



### DESCRIPCIÓ I VALORACIÓ

L'avaluació qualitativa del comportament es basa en la capacitat dels humans per integrar els detalls percebuts del comportament, la postura i el context en les descripcions de l'estil de comportament d'un animal. Aquests termes tenen una connotació expressiva i emocional, i proporcionen informació que és directament rellevant per al benestar animal i pot ser una addició útil a la informació obtinguda a partir d'indicadors quantitius [10].

En aquest sentit es proposa avaluar l'absència de: agressivitat, irritació, alarma, apatia i por.

- **Agressivitat:** atacant, actitud defensiva, mossega, dona coces, etc.
- **Irritació:** per exemple, mostrant moviments ràpids de la cua o “arpejos” constants.
- **Alarma:** tens, nerviós, vigilant, en guàrdia contra una possible amenaça (per exemple, postura rígida, reacció exagerada davant un soroll fort, excessivament atent al seu voltant, moviment anormal de les orelles)
- **Apatia:** mostrar poca o cap emoció; desinteressat, indiferent, aïllat, deprimat, indiferent, immòbil.
- **Por:** espantant, inquiet, neguitós (per exemple, tremola, es mou intentant-se allunyar d'una zona, fosses nassals dilatades, freqüència respiratòria incrementada, cua “amagada”).

### ACCIÓ

Si el veterinari designat detecta la presència d'algun d'aquests comportaments i que pugui ser un problema per l'animal, el genet o la seguretat de les persones, comunicarà la seva troballa al membre designat de la junta de caixers i aquest haurà de comunicar que l'animal avaluat no podrà participar en la colcada.



## A) ABANS DE LES FESTES PATRONALS

**ACCIÓ 1:** El dia abans o el dissabte de la festa (a convenir amb la comissió de benestar animal) els cavalls hauran de ser sotmesos a una inspecció veterinària on es determinarà l'aptitud de l'animal per participar a les festes. En aquesta inspecció es valorarà:

- ✓ El control de documentació dels cavalls participants: identificació i control de vacunes.
- ✓ Una exploració física general.
- ✓ La condició corporal.
- ✓ La presència o absència de coixeses.
- ✓ La presència o absència d'inflamacions articulars.
- ✓ La presència o absència d'alteracions a la pell.
- ✓ La presència o absència de signes de falta de cura dels cascs.
- ✓ La presència o absència de secrecions nasals, oculars o penianes, o tos.
- ✓ La presència o absència de lesions per elements de càstig.
- ✓ La presència o absència de lesions per la muntura o embocadura.
- ✓ La notificació de si l'animal romandrà durant la festa en un estable que no és el seu habitual.

**ACCIÓ 2:** Dies abans de la celebració de les festes la comissió designada pel benestar animal dels cavalls que participen en les festes patronals, realitzarà una inspecció del recorregut per identificar possibles llocs de perill on els cavalls puguin lesionar-se o relliscar i adoptaran les mesures correctores necessàries.

## B) DURANT LES FESTES PATRONALS

**ACCIÓ 1:** L'Ajuntament en qüestió delimitarà un lloc habilitat com a "clínica veterinària de camp" on els veterinaris puguin realitzar les intervencions que es requereixin de la mateixa manera que ho fan per la creu roja o protecció civil.

**ACCIÓ 2:** L'Ajuntament en qüestió habilitarà un lloc delimitat (per evitar problemes de seguretat) per realitzar la càrrega i descàrrega dels animals transportats en remolc. El veterinari designat supervisarà que (1) els animals s'han transportat en mitjans de transport que garanteixen el seu benestar i compleixen la normativa vigent sobre benestar durant el transport; (2) la càrrega i descàrrega dels animals es fa de manera tranquil·la, evitant al màxim l'estrès als animals (sobretot, és important evitar crits i cops, i assegurar-se de que les rampes de pujada i baixada al camió, si n'hi ha, no rellisquin).

**ACCIÓ 3:** Abans de l'inici del replec el/els veterinaris designats comprovaran que cap dels animals que participen a la colcada es troben sota els efectes de sedants o estimulants.

**ACCIÓ 4:** Durant la celebració de les festes patronals la comissió de benestar haurà de garantir les següents mesures de benestar:

- ✓ Bona nutrició
  - Disponibilitat d'aigua en els punts de descans dels animals, tal i com s'ha indicat prèviament en la descripció de l'indicador en qüestió.
  - Es recomana que en descansos de 1-2h tots els cavalls tinguin a disposició fenc, aproximadament 1-2 kg/cavall.
- ✓ Bona estabulació i descans
  - El confort tèrmic mitjançant la presència de zones d'ombres durant els descansos, tal i com s'ha indicat prèviament en la descripció de l'indicador en qüestió.
  - Es recomana la presència de punts on es pugui refrescar l'animal (amb mànigues o dutxes amb aigua fresca i corrent) si el caixer o cavaller ho considera o si el veterinari designat ho recomana.
  - En cap cas els cavalls es podran mantenir tancats en un remolc (amb o sense ventilació) durant la celebració de les misses.
- ✓ Bona salut
  - Absència de lesions (coixesa, inflamacions articulars i alteracions a la pell).
  - Absència de malalties relacionades amb l'esforç (dolor abdominal, deshidratació, rabdomiòlisi).
  - Absència de desconfort i lesions induïdes pel maneig (lesions per elements de càstig o per muntura i embocadura).
- ✓ Comportament apropiat
  - Absència d'estat emocional negatiu (avaluació qualitativa del comportament).

## **C) DESPRÉS DE LES FESTES PATRONALS**

**ACCIÓ 1:** El dia després o en finalitzar la festa (a convenir amb la comissió de benestar animal) els cavalls hauran de ser sotmesos a una inspecció veterinària on es valorarà:

- ✓ Absència de lesions (coixesa, inflamacions articulars i alteracions a la pell).
- ✓ Absència de malalties relacionades amb l'esforç (dolor abdominal, deshidratació, rabdomiòlisi, o laminitis)<sup>1</sup>.
- ✓ Absència de desconfort i lesions induïdes pel maneig (lesions per elements de càstig o per muntura i embocadura).

---

<sup>1</sup> La monitorització de la temperatura rectal després de l'exercici és fonamental per a detectar de manera precoç l'estrès tèrmic. És recomanable prendre la temperatura a tots els cavalls durant els 10-15 minuts d'haver finalitzat l'exercici, i en cas de dubte, de forma repetida durant la primera hora d'acabar l'exercici.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lund, V.; Coleman, G.; Gunnarsson, S.; Appleby, M.C.; Karkinen, K. Animal welfare science—Working at the interface between the natural and social sciences. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2006, 97, 37–49, doi:10.1016/j.applanim.2005.11.017.
2. Carezzi, C.; Verga, M. Animal welfare: review of the scientific concept and definition. *Ital. J. Anim. Sci.* 2009, 8, 21–30, doi:10.4081/ijas.2009.s1.21.
3. Manteca, X. Introducción al bienestar animal. In *Bienestar Animal*; MultiméDica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 3–12 ISBN 978-84-96344-96-9.
4. Manteca, X. Emociones y estrés. In *Bienestar Animal*; MultiméDica Ediciones Veterinarias: Sant Cugat del Vallès (Barcelona), 2021; pp. 21–34 ISBN 978-84-96344-96-9.
5. Hausberger, M.; Roche, H.; Henry, S.; Visser, E.K. A review of the human–horse relationship. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008, 109, 1–24, doi:10.1016/j.applanim.2007.04.015.
6. Blokhuis, H.J.; Veissier, I.; Miele, M.; Jones, B. The welfare quality® project and beyond: Safeguarding farm animal well-being. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* 2010, 60, 129–140, doi:10.1080/09064702.2010.523480.
7. Viksten, S.M.; Visser, E.K.; Nyman, S.; Blokhuis, H.J. Developing a horse welfare assessment protocol. *Anim. Welf.* 2017, 26, 59–65, doi:10.7120/09627286.26.1.059.
8. Australian Horse Industry Council (AHIC) Australian Horse Welfare Protocol; 2011;
9. Wageningen UR Livestock Research Welfare Monitoring System-Assessment Protocol for Horse Available online: <https://edepot.wur.nl/238619>.
10. Minero, M.; Dalla-Costa, E.; Dai, E.; Scholz, P.; Lebelt, D. AWIN welfare assessment protocol for horses; 2015;
11. Carroll, C.L.; Huntington, P.J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.* 1988, 20, 41–45, doi:10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x.
12. McCutcheon, L.J.; Geor, R.J. Thermoregulation and exercise-associated heat illnesses. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 901–918.
13. Kaneps, A.J. Diagnosis of lameness. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 239–251.

14. Nieto, J. Gastrointestinal diseases of athletic horses. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 999–1009.
15. Sanchez, L.C. Disorders of the Gastrointestinal System. In *Equine Internal Medicine*; Elsevier, 2018; pp. 709–842.
16. Piercy, R.J.; Rivero, J.-L.L. Muscle disorders of equine athletes. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 109–143.
17. Hardy, J. Emergency procedures and first aid for the equine athlete. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 1157–1170.
18. Kaneps, A.J. Diseases of the foot. In *Equine Sports Medicine and Surgery*; Elsevier, 2014; pp. 253–274.





# DISCUSSIÓ GENERAL



Els objectius de la present tesi doctoral eren **(1)** caracteritzar les variacions estacionals de cortisol, testosterona i sulfat de deshidroepiandrosterona i les seves ràtios en pèl al llarg d'un any com a mesura retrospectiva de l'activitat dels eixos hipotalàmic-hipofisiari-adrenal i gonadal, **(2)** caracteritzar la resposta d'estrès a través de l'anàlisi del cortisol salival, plasmàtic, i un estudi hematològic complet en cavalls durant una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals de Menorca, **(3)** caracteritzar la resposta d'estrès mitjançant l'anàlisi del cortisol salival en cavalls durant la celebració de les festes patronals de Maó, i **(4)** dissenyar, descriure i adaptar l'aplicació d'un protocol que permeti l'avaluació del benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca de forma objectiva i pràctica. Els objectius exposats prèviament es veuen plasmatats en els Capítols I, II, III, i IV de la present tesi doctoral.

## **MÈTODES DE DETECCIÓ HORMONAL I VALIDACIÓ BIOQUÍMICA**

La quantificació d'hormones esteroidals en una gran varietat de matrius s'ha convertit en una tendència en diversos camps de la recerca i específicament en l'estudi dels marcadors fisiològics de la resposta d'estrès [1]. En conseqüència, s'utilitzen diferents mètodes pel processament, anàlisi i quantificació d'hormones esteroidals entre laboratoris comportant una dificultat en la reproductibilitat i la interpretació de les dades obtingudes [2,3]. Així doncs, la validació i estandardització de cada nova matriu i espècie hauria de ser, per tant, el primer pas per justificar la rellevància biològica dels resultats [4,5], a pesar que aquest pas s'oblida sovint en la literatura publicada [6]. En la present tesi doctoral, s'han fet servir tres matrius diferents (pèl, saliva i plasma) i una sola espècie i raça (cavall de raça menorquina). En conseqüència a l'exposat anteriorment, els tres primers capítols de la present tesi doctoral recullen la corresponent validació bioquímica del mètode d'anàlisi utilitzat i, per tant, suposen un aspecte cabdal per al desenvolupament d'aquest treball.

La determinació hormonal del cortisol i la testosterona (Capítols I, II, i III) es va realitzar mitjançant l'ús d'immunoassaigs enzimàtics comercials (Neogen® Corporation, Ayr, UK). Pel que fa a la DHEA-S es va utilitzar una casa comercial diferent (IBL International GmbH®, Hamburg, Germany). Ambdós tipus d'immunoassaigs enzimàtics es van seleccionar pel seu apreciable rang de detecció i per l'experiència prèvia en la seva utilització per part del nostre grup en un ampli ventall de matrius i espècies diferents (e.g.: [7–13]). Cal destacar, però, que els immunoassaigs enzimàtics utilitzats en la present tesi doctoral no eren específics per les matrius i l'espècie avaluades. Aquest fet, i amb els resultats obtinguts i les corresponents validacions bioquímiques, que discutirem a continuació, posen en relleu la seva fiabilitat i el seu ús potencial per la recerca,



postulant-se com un mètode valuós per la quantificació hormonal per quan no es disposi d'un immunoassaig enzimàtic ni espècie ni matriu específic, com en els casos exposats en la present tesi doctoral.

L'extracció de les hormones esteroidals en pèl de cavall es va realitzar mitjançant l'adaptació d'un protocol prèviament establert al nostre laboratori [8] dissenyat i validat específicament per la quantificació d'hormones esteroidals en pèl de vedell. Seguint el mateix procediment, al Capítol I es presenta la validació bioquímica de tres hormones diferents (cortisol, testosterona i DHEA-S) per una matriu, el pèl, i una espècie, el cavall. Els resultats obtinguts en la validació bioquímica van resultar ser fiables i repetibles i, per tant, es va demostrar la precisió, especificitat, i sensibilitat dels kits d'immunoassaig enzimàtic utilitzats per la detecció de cortisol, testosterona i DHEA-S en pèl de cavall [8,10]. Els resultats obtinguts en la validació bioquímica de la testosterona i la DHEA-S són els primers a ser publicats emprant el mètode i matriu esmentats. Fins al moment les escasses publicacions existents havien fet servir altres mètodes com la quimioluminescència [14] o els radioimmunoassaigs [15,16]. Tal com hem indicat anteriorment, als Capítols II i III, les matrius utilitzades van ser el plasma i la saliva. Els resultats obtinguts van ser també fiables i repetibles, posant en relleu la validesa biològica dels resultats obtinguts.

## **HORMONES ESTEROIDALS EN PÈL COM A INDICADORS FISIOLÒGICS DE LA RESPOSTA D'ESTRÈS**

Un dels objectius principals del primer capítol era estimar les variacions de cortisol en pèl al llarg d'un any com a mesura retrospectiva de l'activitat de l'eix HHA. Les característiques pròpies d'aquesta matriu (fàcils condicions d'emmagatzematge [17], poca invasivitat en la seva obtenció [17], i informació de l'activitat adrenal i gonadal retrospectiva a llarg termini [18,19]) i d'acord amb l'objectiu feien idònia la seva utilització. Els principals resultats obtinguts en aquest estudi van determinar que les concentracions de cortisol en pèl en cavalls participants en les festes patronals de Menorca mostraven un increment progressiu des de la tardor fins a obtenir les concentracions màximes a l'estiu, coincidint amb la celebració de les festes patronals. Aquest increment progressiu també coincidia amb un increment substancial de les sessions d'entrenament dels cavalls avaluats. L'exposició continuada a un factor potencialment estressant com seria la participació reiterada en les festes patronals i un increment de la freqüència i intensitat de les sessions d'entrenament podria ser una de les causes principals dels resultats obtinguts, tal com s'ha descrit prèviament en humans [20,21]. Més concretament, els atletes avaluats que corrien més quilòmetres a la setmana, entrenaven més hores o participaven en més competicions al llarg de l'any presentaven nivells de

cortisol en pèl més elevats en comparació als controls, així com aquells atletes que practicaven un esport d'intensitat superior [20]. Lamentablement, i a causa de les característiques dels animals avaluats en la present tesi doctoral, no va ser possible disposar d'un grup control que ens permetés avaluar si l'exposició continuada dels animals a aquestes situacions n'era la causa principal.

Per altra banda, les fluctuacions hormonals en pèl també estan subjectes a una sèrie de factors inductors de variabilitat [19,22]. Les característiques intrínseques de l'animal i les característiques pròpies del pèl, dos grups de factors inductors de variabilitat, van ser controlats satisfactòriament en els animals avaluats. Els cavalls inclosos a l'estudi compartien lloc i sistema d'estabulació, disciplina eqüestre, raça, capa, alimentació, condició corporal, sexe i eren d'edat similar. L'homogeneïtzació d'aquests factors posa en relleu un altre dels factors (estacionalitat) que podria ser causa de les variacions en les concentracions de cortisol en pèl observades en el Capítol I. L'estacionalitat com a tal és una variable d'una complexitat considerable perquè està influenciada per nombrosos factors com la temperatura, humitat, hores de llum o condicions meteorològiques en general. En un estudi previ realitzat pel nostre grup de recerca en cavalls localitzats en la mateixa regió climàtica que els cavalls avaluats en la present tesi doctoral i que no participaven en festes patronals, van mostrar variacions de cortisol en pèl equivalents a les presentades en aquesta tesi doctoral [10]. Aquest fet emfatitza un efecte estacional en la secreció de cortisol en cavalls que habiten la regió climàtica de la mediterrània occidental. A banda d'això, també obre la porta a la realització de nous estudis per determinar les possibles implicacions a nivell fisiològic d'aquestes variacions.

Paral·lelament a la quantificació dels nivells de cortisol, també era part de l'objectiu la quantificació dels nivells de testosterona i DHEA-S així com les seves ràtios com a mesura retrospectiva de l'activitat dels eixos hipotalàmic-pituitari-adrenal i gonadal respectivament. Els resultats van mostrar unes concentracions de testosterona significativament menors durant la primavera en comparació a la tardor i les primeres fases d'hivern. Diversos estudis han descrit com dependent de la intensitat i freqüència de l'entrenament les concentracions de testosterona poden variar de manera oposada. Per exemple, Baker et al. [23] van reportar com un entrenament intens i recurrent provocava una disminució dels nivells de testosterona plasmàtics i un augment dels nivells de cortisol. Per altra banda, Golland et al. [24] van descriure com una sessió d'exercici de màxima intensitat provocava un increment sostingut de les concentracions de testosterona durant més d'un dia posteriorment a l'exercici. Aquests resultats no concorden amb els resultats obtinguts en el nostre estudi on les concentracions de testosterona es mantenien estables durant el període d'increment d'activitat relacionat amb les sessions d'entrenament i participació dels cavalls en les

festes patronals. Aquest fet pot ser degut a diversos motius, però principalment es podrien relacionar amb les característiques de la mateixa matriu (pèl) o al mateix efecte de l'estacionalitat. La patent contradicció entre els estudis que fan servir les concentracions de testosterona com a indicador fisiològic de la resposta d'estrès posen en relleu la necessitat de realitzar una caracterització fisiològica i funcional més detallada de la testosterona com a indicador d'estrès relacionat amb l'exercici en cavalls. Pel que fa a la DHEA-S les concentracions van ser significativament majors al final de tardor i principis d'hivern en comparació amb les darreres fases d'hivern. A diferència del cortisol, els estudis que han utilitzat la DHEA-S en cavalls són molt més escassos i ressalten els resultats obtinguts en la present tesi doctoral i constaten, per primer cop en cavalls, una variació estacional de la DHEA-S detectable en el pèl. En general, els resultats obtinguts al Capítol I focalitzen l'estacionalitat com un factor a considerar pel disseny de futurs estudis en què es pretengui avaluar les concentracions de les hormones esmentades de forma retrospectiva com a potencials indicadors fisiològics de la resposta d'estrès en cavalls.

Per altra banda, una altra eina que s'ha proposat per tenir una imatge més completa de l'activitat dels eixos HHA i HHG és el càlcul de les ràtios hormonals [25–28]. En la present tesi doctoral es va explorar la utilització de les ràtios testosterona/cortisol i cortisol/DHEA-S com a mesura complementària. Pel que fa a la relació testosterona/cortisol s'ha postulat com un indicador del desequilibri general entre ambdós eixos [28] i un predictor de comportament agressiu en humans [29]. Una altra aplicació d'aquesta relació és la seva utilització com un indicador general de l'equilibri catabòlic/anabòlic durant l'activitat física, ja que ambdues hormones tenen funcions metabòliques oposades [28,30]. Desafortunadament, el nostre estudi no va anar acompanyat d'observacions comportamentals i, per tant, no es van poder testar la relació de la testosterona i el cortisol amb conductes agressives. Pel que fa a l'equilibri catabòlic/anabòlic tampoc es va trobar una relació directa amb les temporades de més activitat física, ja que la relació era significativament més elevada durant la tardor i principis d'hivern en comparació a l'estiu.

La relació cortisol/DHEA-S, també s'ha proposat com un indicador general del balanç catabòlic/anabòlic, i com un indicador fisiològic d'estrès per les accions oposades als glucocorticoides que té la DHEA o el seu sulfat [27,28]. En general, s'ha suggerit que una relació cortisol/DHEA-S més alta, i que per tant reflecteix un menor equilibri anabòlic, és indicatiu d'un augment d'estrès crònic [27,28]. Els resultats obtinguts en el Capítol I mostren com la relació cortisol/DHEA-S va resultar ser més elevada coincidint amb les temporades en què l'activitat física dels cavalls avaluats començava a incrementar fins a arribar al seu màxim durant els mesos d'estiu i per tant coincidint, també, amb la celebració de les festes patronals. Aquest resultat

concorda amb altres estudis publicats on la utilització de la relació cortisol/DHEA-S s'ha relacionat amb un nivell d'estrès elevat en cavalls amb estereotípies en comparació amb animals sense trastorns conductuals [15], o en cavalls estabulats de forma tradicional versus forma alternativa [31]. La patent contradicció entre les relacions testosterona/cortisol i cortisol/DHEA-S ens suggereixen la relació cortisol/DHEA-S com un possible l'indicador d'elecció per avaluar l'activitat adrenal i l'equilibri catabòlic/anabòlic en cavalls de forma retrospectiva a través del pèl. No obstant la caracterització biològica de l'ús d'aquestes ràtios a través del pèl requereix ser estudiada amb més profunditat per poder ser utilitzada pel monitoratge de la resposta d'estrès en cavalls.

## **CORTISOL EN PLASMA I SALIVA COM A INDICADOR FISIOLÒGIC DE LA RESPOSTA D'ESTRÈS**

El cortisol ha sigut l'indicador de la resposta d'estrès més utilitzat en la present tesi doctoral. Certs autors aconsellen que paral·lelament a la quantificació del cortisol com a indicador fisiològic d'estrès és recomanable l'avaluació d'altres paràmetres tals com paràmetres hematològics, cardiovasculars [32–35] o termogràfics [36–39], per tal d'obtenir una imatge més completa de la resposta generada [40]. No obstant, diversos autors han establert una relació directa entre les concentracions de cortisol i l'àcid làctic en sang [41], la freqüència cardíaca i la freqüència respiratòria, la temperatura rectal [42] i la temperatura ocular [43,44], tots ells indicadors de la intensitat i l'esforç de l'exercici i en conseqüència indicadors de la resposta fisiològica d'estrès.

Els Capítols II i III tenien l'objectiu de caracteritzar la resposta d'estrès, per una banda, generada durant una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals, i per l'altra, durant les celebracions. Durant la sessió d'entrenament es van obtenir uns increments de cortisol salival al voltant del 240% respecte a l'inici de la sessió. En relació amb els increments observats durant les celebracions, es van assolir els increments màxims respecte al grup control durant el matí del segon dia de les dues edicions estudiades (increment del 200 i 300% respectivament). Aquest fet assenyalava com la resposta generada durant les festes patronals i una sessió d'entrenament va ser de magnitud similar. Tal com ha sigut descrit prèviament, el nivell d'entrenament de l'animal pot influir directament en l'activació de l'eix HHA en cavalls. Íntimament relacionat amb el nivell d'entrenament trobem la freqüència d'exposició a un estímul i per tant el grau d'habitució. Per exemple, Cayado et al. [45] van reportar que les variacions de cortisol estaven directament relacionades amb el nivell d'experiència previ en cavalls de doma i salt. En altres paraules, la participació dels cavalls en un concurs de doma o salt va provocar un increment de les

concentracions de cortisol majors en cavalls amb poca experiència en comparació als increments observats en cavalls altament experimentats. Aquest fet també s'ha pogut documentar en humans, on s'ha observat com els increments de cortisol en atletes entrenats exhaustivament, la resposta a un exercici determinat reflecteix el nivell d'entrenament de l'individu [46]. Una altra aproximació a aquest resultat és la possibilitat que un increment d'exposició continuada a l'exercici, o un increment d'activitat durant un període de temps determinat, podria induir un canvi en el nombre de receptors o en la sensibilitat al cortisol per tal d'obtenir la mateixa resposta a nivell sistèmic amb una menor quantitat d'hormona secretada [45]. En conclusió, l'entrenament continu i exhaustiu dels cavalls participants en les festes patronals durant tot l'any, i que s'incrementa durant la temporada d'estiu, situaria els cavalls participants en les festes patronals en condicions òptimes per fer front satisfactòriament a l'increment d'activitat i els potencials estressors que es deriven de la participació en les celebracions.

Un altre dels resultats destacables del Capítol II va ser el retorn més ràpid de les concentracions basals de cortisol en saliva en comparació al plasma. A les dues hores posteriors a la finalització de l'activitat, les concentracions ja no diferien significativament de les obtingudes abans del començament. Aquest resultat concorda amb el descrit per Peeters et al. [47] on van descriure el retorn complet de les concentracions basals de cortisol en saliva 100 minuts abans que en plasma. Aquesta troballa, de rellevància pràctica, postula el cortisol salival com la matriu d'elecció per l'avaluació del restabliment de les concentracions basals de cortisol en cavalls per diversos motius. En primer lloc per la poca invasivitat en l'obtenció de la mostra. En segon lloc perquè el cortisol salival front a un estressor incrementa proporcionalment més que el cortisol plasmàtic [47], i finalment, en tercer lloc, perquè amb la mesura del cortisol salival es quantifica la fracció lliure i per tant amb activitat biològica [48]. Així, aquests factors permeten una determinació més acurada de l'activació i resposta de l'eix HHA i per tant, de la resposta d'estrès.

Pel que fa al Capítol III, i per raons pràctiques i logístiques no es van poder obtenir mostres de les hores successives a la finalització dels actes. No obstant això, es va recol·lectar una mostra de saliva a les 24 h de la finalització de les celebracions i aquesta no diferia significativament de la mostra del grup control. Aquest fet demostra que, almenys, a les 24 h posteriors a la finalització dels actes les concentracions de cortisol es tornen a trobar als nivells previs a la festa, dit en altres paraules, que els cavalls recuperen els nivells basals com a màxim un dia després de les celebracions. Aquest fet és important per dos motius principals: en primer lloc, perquè postula la participació dels animals a les festes patronals com una situació d'estrès agut, tal com s'ha determinat en diferents disciplines equestres com la doma (e.g.: [33,49]), el salt (e.g.: [49,50]), les

curses (e.g.: [41,51]) o les curses de resistència (e.g.: [35,44,52]). En segon lloc, i tenint en compte els possibles efectes negatius del cortisol a llarg termini, obre la porta a determinar quin és l'impacte que l'exposició continuada d'alguns animals a aquests actes té sobre la seva salut i en conseqüència sobre el seu benestar.

## **PROTOCOL D'AVALUACIÓ DE BENESTAR ANIMAL I APLICACIÓ**

El benestar dels cavalls utilitzats per activitats esportives i recreatives és un tema d'importància creixent [33], i en conseqüència s'ha incentivat el desenvolupament d'eines científicament provades per caracteritzar de manera fiable i repetible el seu benestar [40]. Les festes patronals de Menorca suposen una sèrie de potencials reptes pel benestar dels cavalls que hi participen. En aquest sentit, l'objectiu del quart capítol de la present tesi doctoral es va realitzar amb la motivació de dissenyar, descriure i adaptar l'aplicació d'un protocol que permetés l'avaluació del benestar dels cavalls participants en les festes patronals de Menorca des d'un punt de vista objectiu i pràctic. Pel seu disseny es va realitzar una adaptació dels protocols prèviament validats per l'avaluació del benestar de cavalls utilitzats per activitats recreatives i esportives (referència) i que es basen en els criteris i principis de benestar proposats pel *Welfare Quality*® project [53] per tal de garantir un enfocament holístic que compregui les diferents dimensions del benestar animal. En el protocol proposat es van incloure 4 principis, 8 criteris i 16 indicadors.

Pel que fa als principis es van mantenir els 4 principis que regeixen els protocols *Welfare Quality*® [53], amb la modificació del segon principi "bon allotjament" que va ser modificat per "bona estabulació i descans". Generalment, els protocols *Welfare Quality*® [53] o els que d'ells se'n deriven com per exemple l'*AWIN welfare assessment protocol for horses* [54] consten de 12 criteris diferents. La reducció inclosa en el protocol presentat en el Capítol IV rau en la necessitat de ser adaptat a la realitat de les festes patronals de Menorca.

En els protocols descrits anteriorment [54,55] pel principi d'un bon allotjament s'inclou el criteri d'un bon confort tèrmic dirigit principalment a la zona d'allotjament dels animals. En aquest sentit en el protocol proposat pels cavalls participants en les festes patronals es va modificar l'àmbit d'aplicació i es va dirigir a proporcionar zones d'ombra als animals durant els descansos per tal de prevenir problemes derivats d'un possible estrès tèrmic. Pel que fa al criteri d'una bona salut es van mantenir els tres principis proposats pel HWAP i que inclouen l'absència de lesions, l'absència de malalties i l'absència de desconfort causat pel maneig. Pel que fa al criteri d'absència de malalties es va afegir que fossin derivades de l'esforç i es van incloure aquelles de més probable aparició. En relació al criteri d'absència de desconfort induït pel maneig es va incloure el criteri d'absència

de lesions induïdes pels elements de càstig per tal de garantir l'ús correcte dels esperons i/o la serreta. Finalment, en referència al principi "comportament apropiat" es va incloure, exclusivament, el criteri d'un estat emocional positiu centrat en l'absència de conductes negatives com l'agressivitat o la por per facilitar, en aquest cas, la seva avaluació durant la celebració de les festes patronals per part del veterinari designat.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sheriff, M.J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869–887, doi:10.1007/s00442-011-1943-y.
2. Berk, S.A.; McGettrick, J.R.; Hansen, W.K.; Breuner, C.W. Methodological considerations for measuring glucocorticoid metabolites in feathers. *Conserv. Physiol.* 2016, 4, cow020, doi:10.1093/conphys/cow020.
3. Cook, N.J. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can. J. Anim. Sci.* 2012, 92, 227–259, doi:10.4141/cjas2012-045.
4. Touma, C.; Palme, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1046, 54–74, doi:10.1196/annals.1343.006.
5. Palme, R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol. Behav.* 2019, 199, 229–243, doi:10.1016/j.physbeh.2018.11.021.
6. Buchanan, K.L.; Goldsmith, A.R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Anim. Behav.* 2004, 67, 183–185, doi:10.1016/j.anbehav.2003.09.002.
7. Carbajal, A.; Tallo-parra, O.; Monclús, L.; Aresté, M.; Fernández-, H.; Almagro, V.; Lopez-bejar, M. Corticosterone measurement in Komodo dragon shed skin. 2018, 28, 110–116.
8. Tallo-Parra, O.; Manteca, X.; Sabes-Alsina, M.; Carbajal, A.; Lopez-Bejar, M. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal* 2015, 9, 1059–1064, doi:10.1017/S1751731115000294.
9. Gardela, J.; Olvera-Maneu, S.; José-Cunilleras, E.; Lopez-Bejar, M. Cumulative testosterone levels in horses detected in hair: relationship with season, physiological features and stress hormones. *Reprod. Domest. Anim.* 2018, 53, 138 (P109), doi:10.1111/rda.13272.
10. Gardela, J.; Carbajal, A.; Tallo-Parra, O.; Olvera-Maneu, S.; Álvarez-Rodríguez, M.; Jose-Cunilleras, E.; López-Béjar, M. Temporary Relocation during Rest Periods: Relocation Stress and Other Factors Influence Hair Cortisol Concentrations in Horses. *Animals* 2020, 10, 642, doi:10.3390/ani10040642.
11. Monclús, L.; Tallo-Parra, O.; Carbajal, A.; Quevedo, M.A.; Lopez-Bejar, M. Feather corticosterone in Northern Bald Ibis *Geronticus eremita*: a stable matrix over time able to predict reproductive success. *J. Ornithol.* 2020, 161, 557–567, doi:10.1007/s10336-019-01741-z.



12. Serres-Corral, P.; Fernández-Bellon, H.; Padilla-Solé, P.; Carbajal, A.; López-Béjar, M. Evaluation of Fecal Glucocorticoid Metabolite Levels in Response to a Change in Social and Handling Conditions in African Lions (*Panthera leo bleyenberghi*). *Animals* 2021, 11, 1877, doi:10.3390/ani11071877.
13. Carbajal, A.; Reyes-López, F.E.; Tallo-Parra, O.; Lopez-Bejar, M.; Tort, L. Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish. *Aquaculture* 2019, 506, 410–416, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.005.
14. Negretti, C.; Dm, S.; Tm, H.; Ma, K. Comparison of Serum and Hair Testosterone Concentrations in Free-Roaming Stallions Corresponding author: Kutzler MA, Department of Animal and Rangeland Sciences, College of Agricultural. 2019, 7, 5–7.
15. Arena, I.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Bucci, D.; Accorsi, P.A. Assessment of horses' welfare: Behavioral, hormonal, and husbandry aspects. *J. Vet. Behav.* 2021, 41, 82–90, doi:10.1016/j.jveb.2021.01.006.
16. Lanci, A.; Mariella, J.; Ellero, N.; Faoro, A.; Peric, T.; Prandi, A.; Freccero, F.; Castagnetti, C. Hair Cortisol and DHEA-S in Foals and Mares as a Retrospective Picture of Feto-Maternal Relationship under Physiological and Pathological Conditions. *Animals* 2022, 12, 1266, doi:10.3390/ani12101266.
17. Stalder, T.; Kirschbaum, C. Analysis of cortisol in hair - State of the art and future directions. *Brain. Behav. Immun.* 2012, 26, 1019–1029, doi:10.1016/j.bbi.2012.02.002.
18. Gormally, B.M.G.; Romero, L.M. What are you actually measuring? A review of techniques that integrate the stress response on distinct time-scales. *Funct. Ecol.* 2020, 34, 2030–2044, doi:10.1111/1365-2435.13648.
19. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019, 270, 10–17, doi:10.1016/j.ygcen.2018.09.016.
20. Skoluda, N.; Dettenborn, L.; Stalder, T.; Kirschbaum, C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* 2012, 37, 611–617, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.001.
21. Gerber, M.; Brand, S.; Lindwall, M.; Elliot, C.; Kalak, N.; Herrmann, C.; Pühse, U.; Jonsdottir, I.H. Concerns regarding hair cortisol as a biomarker of chronic stress in exercise and sport science. *J. Sports Sci. Med.* 2012, 11, 571–81.

22. Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. Within a hair's breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020, 288, 113359, doi:10.1016/j.ygcen.2019.113359.
23. Baker, H.W.G.; Baker, I.D.C.; Epstein, V.M.; Hudson, B. Effect of stress on steroid hormone levels in racehorses. *Aust. Vet. J.* 1982, 58, 70–71, doi:10.1111/j.1751-0813.1982.tb02692.x.
24. Golland, L.C.; Evans, D.L.; Stone, G.M.; Tyler-McGowan, C.M.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J. Maximal exercise transiently disrupts hormonal secretory patterns in Standardbred geldings. *Equine Vet. J.* 2010, 31, 581–585, doi:10.1111/j.2042-3306.1999.tb05288.x.
25. Romero-Martínez, Á.; Moya-Albiol, L. The Use of Testosterone/Cortisol Ratio in Response to Acute Stress as an Indicator of Propensity to Anger in Informal Caregivers. *Span. J. Psychol.* 2016, 19, E48, doi:10.1017/sjp.2016.62.
26. Mehta, P.H.; Prasad, S. The dual-hormone hypothesis: A brief review and future research agenda. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2015, 3, 163–168, doi:10.1016/j.cobeha.2015.04.008.
27. Whitham, J.C.; Bryant, J.L.; Miller, L.J. Beyond Glucocorticoids: Integrating Dehydroepiandrosterone (DHEA) into Animal Welfare Research. *Animals* 2020, 10, 1381, doi:10.3390/ani10081381.
28. Sollberger, S.; Ehlert, U. How to use and interpret hormone ratios. *Psychoneuroendocrinology* 2016, 63, 385–397, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.031.
29. Mehta, P.H.; Josephs, R.A. Testosterone and cortisol jointly regulate dominance: Evidence for a dual-hormone hypothesis. *Horm. Behav.* 2010, 58, 898–906, doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.020.
30. Daly, W.; Seegers, C.A.; Rubin, D.A.; Dobridge, J.D.; Hackney, A.C. Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2005, 93, 375–380, doi:10.1007/s00421-004-1223-1.
31. Placci, M.; Marliani, G.; Sabioni, S.; Gabai, G.; Mondo, E.; Borghetti, P.; De Angelis, E.; Accorsi, P.A. Natural Horse Boarding Vs Traditional Stable: A Comparison of Hormonal, Hematological and Immunological Parameters. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2020, 23, 366–377, doi:10.1080/10888705.2019.1663737.
32. Bohák, Z.; Szenci, O.; Harnos, A.; Kutasi, O.; Kovács, L. Effect of temperament on cortisol response to a single exercise bout in Thoroughbred racehorses – short communication. *Acta Vet. Hung.* 2017, 65, 541–545, doi:10.1556/004.2017.052.

33. Christensen, J.W.; Beekmans, M.; van Dalum, M.; VanDierendonck, M. Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses. *Physiol. Behav.* 2014, 128, 39–45, doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.024.
34. Janczarek, I.; Wilk, I.; Stachurska, A.; Krakowski, L.; Liss, M. Cardiac activity and salivary cortisol concentration of leisure horses in response to the presence of an audience in the arena. *J. Vet. Behav.* 2019, 29, 31–39, doi:10.1016/j.jveb.2018.07.007.
35. Contreras-Aguilar, M.D.; Cerón, J.J.; Muñoz, A.; Ayala, I. Changes in saliva biomarkers during a standardized increasing intensity field exercise test in endurance horses. *Animal* 2021, 15, 100236, doi:10.1016/j.animal.2021.100236.
36. Redaelli, V.; Luzi, F.; Mazzola, S.; Bariffi, G.; Zappaterra, M.; Nanni Costa, L.; Padalino, B. The Use of Infrared Thermography (IRT) as Stress Indicator in Horses Trained for Endurance: A Pilot Study. *Animals* 2019, 9, 84, doi:10.3390/ani9030084.
37. Soroko, M.; Śpitalniak-Bajerska, K.; Zaborski, D.; Poźniak, B.; Dudek, K.; Janczarek, I. Exercise-induced changes in skin temperature and blood parameters in horses. *Arch. Anim. Breed.* 2019, 62, 205–213, doi:10.5194/aab-62-205-2019.
38. Valera, M.; Bartolomé, E.; Sánchez, M.J.; Molina, A.; Cook, N.; Schaefer, A. Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. *J. Equine Vet. Sci.* 2012, 32, 827–830, doi:10.1016/j.jevs.2012.03.005.
39. Esteves Trindade, P.H.; de Camargo Ferraz, G.; Pereira Lima, M.L.; Negrão, J.A.; Paranhos da Costa, M.J.R. Eye Surface Temperature as a Potential Indicator of Physical Fitness in Ranch Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 75, 1–8, doi:10.1016/j.jevs.2018.11.015.
40. Waran, N.; Randle, H. What we can measure, we can manage: The importance of using robust welfare indicators in Equitation Science. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2017, 190, 74–81, doi:10.1016/j.applanim.2017.02.016.
41. Kędzierski, W.; Strzelec, K.; Cywińska, A.; Kowalik, S. Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2013, 33, 1106–1109, doi:10.1016/j.jevs.2013.04.011.
42. Casella, S.; Vazzana, I.; Giudice, E.; Fazio, F.; Piccione, G. Relationship between serum cortisol levels and some physiological parameters following reining training session in horse. *Anim. Sci. J.* 2016, 87, 729–735, doi:10.1111/asj.12478.

43. Yarnell, K.; Hall, C.; Billett, E. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. *Physiol. Behav.* 2013, 118, 32–39, doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.013.
44. de Mira, M.C.; Lamy, E.; Santos, R.; Williams, J.; Pinto, M.V.; Martins, P.S.; Rodrigues, P.; Marlin, D. Salivary cortisol and eye temperature changes during endurance competitions. *BMC Vet. Res.* 2021, 17, 1–12, doi:10.1186/s12917-021-02985-9.
45. Cayado, P.; Muñoz-Escassi, B.; Domínguez, C.; Manley, W.; Olabarri, B.; De La Muela, M.S.; Castejon, F.; Marañon, G.; Vara, E. Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet. J.* 2006, 38, 274–278, doi:10.1111/j.2042-3306.2006.tb05552.x.
46. Healy, M.L.; Gibney, J.; Pentecost, C.; Wheeler, M.J.; Sonksen, P.H. Endocrine profiles in 693 elite athletes in the postcompetition setting. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2014, 81, 294–305, doi:10.1111/cen.12445.
47. Peeters, M.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Ledoux, D.; Vandenheede, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* 2011, 43, 487–493, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00294.x.
48. Hellhammer, D.H.; Wüst, S.; Kudielka, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34, 163–171, doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
49. Becker-Birck, M.; Schmidt, A.; Lasarzik, J.; Aurich, J.; Möstl, E.; Aurich, C. Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013, 8, 87–94, doi:10.1016/j.jveb.2012.05.002.
50. Jastrzębska, E.; Wolska, A.; Minero, M.; Ogluszka, M.; Earley, B.; Wejer, J.; Górecka-Bruzda, A. Conflict Behavior in Show Jumping Horses: A Field Study. *J. Equine Vet. Sci.* 2017, 57, 116–121, doi:10.1016/j.jevs.2017.07.009.
51. Kedziński, W.; Cywińska, A.; Strzelec, K.; Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* 2014, 85, 313–317, doi:10.1111/asj.12146.
52. Janczarek, I.; Bereznowski, A.; Strzelec, K. The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Pol. J. Vet. Sci.* 2013, 16, 533–541, doi:10.2478/pjvs-2013-0074.
53. Blokhuis, H.J.; Veissier, I.; Miele, M.; Jones, B. The welfare quality® project and beyond: Safeguarding farm animal well-being. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* 2010, 60, 129–140, doi:10.1080/09064702.2010.523480.

54. Minero, M.; Dalla-Costa, E.; Dai, E.; Scholz, P.; Lebelt, D. AWIN welfare assessment protocol for horses; 2015;
55. Viksten, S.M.; Visser, E.K.; Nyman, S.; Blokhuis, H.J. Developing a horse welfare assessment protocol. *Anim. Welf.* 2017, 26, 59–65, doi:10.7120/09627286.26.1.059.

# CONCLUSIONS



En funció de l'exposat en la present tesi doctoral s'estableixen les següents conclusions:

Objectiu 1:

**Conclusió 1.1.** Les concentracions de cortisol, testosterona i DHEA-S en pèl de cavall varien estacionalment posant en relleu la importància de considerar l'estacionalitat com un factor influent en els estudis de monitoratge de la resposta d'estrès.

**Conclusió 1.2.** L'ús de les ràtios cortisol/DHEA-S i Testosterona/Cortisol requereix ser estudiat en profunditat per ser utilitzat en els estudis de monitoratge de la resposta d'estrès en cavalls.

Objectiu 2:

**Conclusió 2.1.** La participació dels cavalls en una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals de Menorca genera una resposta d'estrès mesurable a través de la quantificació del cortisol salival, plasmàtic i l'estudi hemàtic complet.

**Conclusió 2.2.** La saliva seria la matriu d'elecció per monitorar el retorn del cortisol a les concentracions basals després d'un exercici en cavalls.

Objectiu 3:

**Conclusió 3.1.** La participació dels cavalls en les festes patronals de Menorca genera una resposta d'estrès aguda i transitòria que desapareix en les 24 hores posteriors a la finalització dels actes i que es pot mesurar a través del cortisol salival.

**Conclusió 3.2.** La resposta d'estrès generada i mesurada a través del cortisol salival és similar en magnitud a la generada per una sessió d'entrenament estàndard per participar en les festes patronals o a la generada en altres disciplines eqüestres.

Objectiu 4:

**Conclusió 4.1.** L'adaptació i aplicació d'un protocol d'avaluació de benestar animal pels cavalls participants en les festes patronals de Menorca permetrà la seva avaluació des d'un punt de vista objectiu.



