

TRATAMIENTO CON TRIPTOFANO DE LOS DESÓRDENES DE ANSIEDAD, CONSECUENTES AL ESTRÉS EN PERROS ALOJADOS EN ALBERGUES

The Use of Tryptophan in Shelter Dogs to Treat Stress-related Anxiety Disorders

Bernadette Anzola^{1*}, Miguel Ibáñez², Susana Morillas², Ricardo Benedetti², Julia Pérez² y Daniela Farías²

¹Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado", Departamento de Producción Animal Núcleo Tarabana, 3001, estado Lara, Venezuela. ²Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Clínica del Comportamiento Animal, Departamento de Producción Animal. Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, España. mibanez@vet.ucm.es

RESUMEN

Se realizó un estudio en 53 perros alojados en albergues con altos niveles de ansiedad para determinar las respuestas clínicas al tratamiento con triptófano. Se evaluó semanalmente el efecto de la dieta sobre el comportamiento y los niveles de cortisol fecal durante las seis semanas del estudio. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (Trp-1 y Trp-2) según los niveles de triptófano administrados. El triptófano fue administrado oralmente a través de la dieta recibiendo cada grupo durante la primera semana una alimentación estándar considerada como control; posteriormente el grupo Trp-1 recibió un 0,6% más de triptófano y el grupo Trp-2 un 1,2% más respecto de la dieta estándar. Se encontraron diferencias entre ambos grupos de tratamiento. Las diferencias solo fueron significativas ($P < 0,05$) para el comportamiento social en la última semana. Las diferencias estudiadas indicaron que los perros dedicaron menos tiempo a las conductas anormales ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) que otros comportamientos. Igualmente se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los niveles de cortisol entre la primera y la sexta semana. Los valores de cortisol mostraron una tendencia numérica inferior, pero no significativa ($P > 0,05$) entre la quinta y la primera semana de tratamiento.

Palabras clave: Perro, triptófano, cortisol, ansiedad, comportamiento.

ABSTRACT

Fifty-three sheltered dogs exhibiting high anxiety levels were studied for a period of six weeks in order to evaluate clinical responses to treatment with tryptophan. The effect of the diet on the behavior and fecal cortisol levels were assessed weekly throughout the study. The animals were randomly separated into two groups (Trp-1 and Trp-2) according to the amounts of administered tryptophan. Each group received the diet orally during the first week considering as a standard diet control; the Trp-1 group received 0.6% of tryptophan and the Trp-2 group received 1.2%. Differences were found between the treatment groups. These differences were only significant ($P < 0.05$) in regards to the social behavior during the final week. The results indicated that the dogs spent less time engaged in abnormal behaviors ($P < 0.05$ and $P < 0.001$) than in other behaviors. Likewise, significant differences in cortisol levels ($P < 0.05$) were detected between the first and the sixth week. Cortisol values were lower, although not significantly ($P > 0.05$) between the fifth and first week of treatment. No correlation was found between cortisol levels and the increase of behaviors studied.

Key words: Dog, tryptophan, cortisol, anxiety, behavior.

INTRODUCCIÓN

Los albergues para animales representan un ambiente extremadamente estresante para los perros (*Canis lupus familiaris*), debido principalmente al aislamiento proporcionado y a la sensación de abandono [8]. En estudios anteriores [8, 13, 14, 15] se ha comprobado que el efecto estresante que se produce en los perros alojados en albergues de acogida induce a aumentar los ladridos, jadeos y salivación, así como deambulación dentro de la jaula entre otras. El cambio significativo en

la vida del animal o aquellas situaciones capaces de producir estrés agudo o postraumático producen una alteración de la homeostasis y un trastorno de adaptación, los cuales son causantes de cuadros de ansiedad [5,6]. Anteriormente [28] se ha demostrado que existe una relación entre el estrés y la aparición de ansiedad, aunque hasta ahora hay pocos estudios realizados. Para el control de la ansiedad y reducción del estrés en perros se han utilizado psicofármacos entre los cuales se pueden mencionar: ansiolíticos y antidepressivos; sin embargo, cada día se incrementa el uso de otros compuestos que no se clasifican como drogas psicotrópicas, tales como las feromonas y los nutracéuticos [1].

El efecto de la administración de triptófano sobre el comportamiento de los mamíferos ha sido estudiado por diversos autores como alternativa contra los efectos del estrés [4, 16, 20, 25, 26]. El uso terapéutico de triptófano se basa en el hecho de que las variaciones de los niveles de este aminoácido en el cerebro pueden influir en la síntesis de serotonina. Se ha comprobado que la serotonina disminuye los comportamientos agresivos [19]. Por otro lado, el triptófano ha demostrado tener actividad psicofarmacológica y ser eficaz en la reducción de la agresión y otros comportamientos no deseados en mamíferos [23]. También es conocido, que proporcionar una alimentación con dietas de alto contenido proteico reduce la disponibilidad de triptófano, ya que los aminoácidos de cadena larga afectan el paso de triptófano a través de la barrera hematoencefálica [38]. De igual forma, existen trabajos que indican que una disminución de la disponibilidad de triptófano conlleva a la aparición de comportamientos relacionados con ansiedad y depresión [2, 40]. En un estudio realizado [34] se comprobó que, esta disminución produjo en ratas (*Rattus norvegicus*) una alteración en la respuesta emocional al estrés. Por el contrario, una dieta baja en proteínas propicia una mayor transferencia de triptófano [37]. Además, ya se ha encontrado una relación entre el contenido de proteínas de la dieta, el metabolismo del triptófano y el comportamiento agresivo en los perros [12]. Incluso, se ha comprobado una menor incidencia de comportamientos agresivos en perros alimentados con dietas bajas en proteínas y si éstas se suplementaban con triptófano la agresividad era aún menor [10]. En otras especies animales, la suplementación de triptófano en la dieta redujo la aparición de trastornos de comportamiento [18, 19, 26, 35].

En situaciones estresantes, el organismo animal reacciona secretando grandes cantidades de cortisol, con el fin de hacer frente a la situación de estrés para reparar los daños y perjuicios que tal situación pudiera haber causado en el organismo animal [31]. También se ha señalado que los glucocorticoides tienen al menos dos modos de acción sobre el Sistema Nervioso Central (SNC): uno, se asocia con la percepción y la coordinación de los ciclos circadianos en la ingesta de alimentos y en el sueño, y el otro actúa sobre procesos metabólicos y de estrés [7]. El nivel de cortisol se ha utilizado como indicador de estrés fisiológico en los animales [3, 9, 36]; esto puede medirse a partir de diferentes muestras biológicas como las heces, que se han utilizado para dichas pruebas aplicadas en perros [11, 32]. La composición de

los alimentos ha sido reportada como un aspecto importante que tiene influencia sobre el comportamiento de animales y humanos, y que puede contribuir a reducir comportamientos indeseables en perros. Los desórdenes relacionados con la ansiedad han sido asociados con el funcionamiento del sistema serotoninérgico y se han hecho investigaciones para determinar la influencia sobre el comportamiento con la administración de triptófano a través de la dieta en perros que viven con sus dueños, éstas concluyeron que no hubo cambios en los comportamientos de estos perros que no presentaban signos claros de comportamientos anormales, quedando por determinar los posibles efectos en perros crónicamente estresados o diagnosticados con patologías del comportamiento [3].

Son muy escasos los estudios centrados en conseguir un tratamiento médico sin riesgos de efectos secundarios, que pudiera usarse a largo plazo, llegando a ser efectivo para combatir el estrés que conlleva a la aparición de desórdenes de comportamiento en perros alojados en albergues. Por ello, este estudio con el triptófano, como tratamiento para los desórdenes de ansiedad en perros alojados en albergues, que han sido sometidos a estrés crónico, podría determinar los posibles efectos sobre los signos de ansiedad, de este aminoácido suplementando en la dieta y de esta forma contribuiría a proporcionarles una mejor calidad de vida y una menor tasa de muertes por eutanasia a los perros en los albergues de acogida.

El objetivo principal de este estudio consistió en evaluar el efecto de dos niveles de triptófano sobre el comportamiento, midiendo los niveles de cortisol presentes en las heces de los perros con desórdenes de ansiedad alojados en albergues, sometidos al estrés crónico que conlleva el confinamiento, el aislamiento y la privación de recursos; el segundo objetivo fue determinar si había correlación entre el comportamiento observado (estrés-calma) y los niveles de cortisol de los perros en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La experiencia fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo de la Comisión de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad Complutense de Madrid. Es de hacer notar que la estancia de los perros alojados en el refugio escogidos para este estudio se debe al abandono voluntario por parte de sus dueños o al rescate realizado por el personal que labora en este refugio, quienes acuden a la recogida de los perros debido a denuncias de maltrato, también denuncias de mascotas perdidas deambulando por la calle entre otras. Las condiciones para seleccionar a los perros fueron, que manifestaran estados de ansiedad, miedos, fobias, estereotipias, agresividad y/o depresión (TABLA I). La muestra fue de sesenta perros, en edades comprendidas entre 9 meses y 10 años, sin importar la raza o sexo; se excluyeron las hembras preñadas. De los sesenta escogidos, siete no completaron el estudio, de éstos, cuatro fueron adoptados y tres fueron excluidos por presentar cuadros diarreicos, atribuidos al cambio de la dieta.

TABLA I
DESÓRDENES DE COMPORTAMIENTO CONSIDERADOS
COMO CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS PERROS
EN EL ESTUDIO

Miedo y pánico	Reacción emocional desencadenada por una agresión o estímulo desconocido que se produce cuando la huida es imposible. Los perros pueden mostrar un comportamiento sumiso (evitación de contacto con los ojos, orinarse, adoptar la posición en la que exponen el vientre), o pueden tomar posturas en las que permanecen inmóviles. Son compatibles también determinadas posturas del cuerpo, incluyendo la de bajar la cabeza, aplanando las orejas hacia atrás, y meter la cola entre las patas. El perro también puede salivar y/o temblar. En los casos extremos (pánico), los perros pueden ser destructivos o pueden perder el control de su vejiga o el intestino.
Fobia	Se define como un miedo irracional que produce una evitación consciente del sujeto temido, actividad o situación.
Estereotipias	Este comportamiento incluye acciones repetitivas, como la automutilación, dar vueltas haciendo círculos, perseguirse la cola, lamidos excesivos de los flancos y morder el aire, como atrapando moscas con la boca, entre otros.
Agresividad	La agresividad del perro es cualquier comportamiento destinado a intimidar o dañar a una persona o a un animal. Gruñir, enseñar los dientes, emitir gruñidos y morder.
Ansiedad	Es un estado que comprende algunos signos como la vocalización excesiva, inquietud, agitación, miedo, hiperactividad, hipervinculación, irritabilidad, inseguridad, falta de atención, nerviosismo y temblores.
Depresión	Un estado general de atonía de la conducta (posturas que sugieren flacidez corporal, y falta de respuesta a estímulos, dando una apariencia general de desánimo).

Los 53 perros integrados en el estudio fueron alojados de forma individual y asignados aleatoriamente en dos grupos (Trp-1 y Trp-2), ambos fueron alimentados durante la 1ª semana con una dieta que cumple los requerimientos nutritivos estándar para perros adultos [27], el estudio duró seis semanas, considerándose a este período de tiempo como control para las siguientes determinaciones: desde la 2ª hasta la 5ª semana, durante 28 días, el grupo Trp-1 recibió una dieta baja en proteínas suplementada con el doble de los requerimientos nutritivos estándar de triptófano y el grupo Trp-2 recibió una dieta baja en proteínas, complementada con cuatro veces los requerimientos estándar de triptófano (TABLA II). Finalmente, los grupos Trp-1 y Trp-2 fueron alimentados durante la 6ª semana con la dieta estándar para perros adultos o dieta control.

TABLA II
COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES
EN PORCENTAJE DE NUTRIENTES

Nutrientes	Estandar	Trp-1	Trp-2
Proteínas	24,384	21,626	19,715
Grasa	6,076	8,871	5,435
Fibra cruda	8,172	4,789	3,623
Cenizas	8,216	9,823	8,980
Amino acidos			
Triptofano	0,347	0,619	1,252
Arginina	1,119	1,006	0,928
Histidina	0,416	0,365	0,335
Isoleucina	0,834	0,730	0,670
Leucina	1,342	1,172	1,084
Lisina	1,183	1,028	0,950
Metionina-cistina	0,904	0,785	0,726
Fenilalanina	1,1671	1,460	1,341
Treonina	1,090	0,951	0,872
Valina	0,904	0,785	0,715
Otros A-A	14,52	12,721	11,753

Con el fin de comparar el efecto de los tratamientos de triptófano sobre el comportamiento y los niveles fecales de cortisol, los datos fueron clasificados en tres períodos (basal, tratamiento y final) de acuerdo con el tiempo de estudio. El basal (B) fue considerado el período de tiempo en el que se administró la dieta estándar únicamente, el final (F) correspondió al periodo pos tratamiento con triptófano, en el que se administró nuevamente la dieta estándar y el tratamiento (T) correspondió al periodo de tiempo en el que se suministraron las dietas enriquecidas con triptófano.

Para determinar el tiempo dedicado a los diferentes comportamientos así como las variaciones en los niveles de cortisol fecal fueron clasificados en tres grupos (Inc-1, Inc-2 y Inc-3). Inc-1 describe la diferencia de incremento de los comportamientos y las mediciones de cortisol fecal calculadas entre los períodos tratamiento y basal (T menos B), Inc-2 a su vez describe la diferencia entre los períodos final y tratamiento (F menos T), e Inc-3 fue la diferencia entre los períodos final y basal (F menos B).

Observaciones en el comportamiento

La proporción de tiempo dedicado a cada uno de los comportamientos estudiados fue determinada por muestreos de barrido instantáneo (scan sampling instantaneous) a intervalos de 3 minutos [21]. Los comportamientos anormales observados incluyeron miedo, fobia, estereotipias, agresividad, ansiedad y depresión (TABLA I). Mientras que en los comportamientos considerados como normales se observaron: descanso, social, locomoción, exploración (incluyendo curiosidad ante la presencia del observador) entre otros.

Análisis de cortisol

Para la medición de las concentraciones de cortisol se recogieron muestras de heces, de cada perro al final de la 1ª, 5ª y 6ª semanas coincidiendo con el final de los períodos de estudio (basal, tratamiento y final). Las muestras se tomaron a las 9.30 de la mañana (media hora antes de realizar la limpieza) se congelaron y pulverizaron utilizando los métodos establecidos para la extracción de adrenocorticoides [13, 39] mediante un Evaporador TurboVap LV Evaporator, marca: Zymark Corporation Massachussets, EUA, modelo: ZW700i; un congelador Fagor CFS-30, 98 4B 00007, España, y un pulverizador manual con mortero y maza de metal, y se analizaron en los laboratorios de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el General Linear Models Procedure of SAS (versión 9.1.3, año 2007; Inst.; Inc.; EUA). La prueba de rangos signados de Wilcoxon se usó para determinar la diferencia de los comportamientos estudiados y los niveles de cortisol en heces en los períodos establecidos según la dieta recibida (basal, tratamiento y final) y para estudiar las diferencias entre tratamientos fue utilizado el test de Mann-Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cincuenta y tres perros completaron el estudio, de los cuales veintiocho correspondían al grupo Trp-1, y veinticinco al grupo Trp-2. Se observó un aumento de los comportamientos estudiados en el grupo de los animales alimentados con una alta concentración de triptófano (Trp-2), aunque el comportamiento social fue más elevado con diferencias significativas ($P < 0,05$) durante el período final del tratamiento (TABLA III). En la TABLA IV se encuentran los valores de las diferencias en relación a los incrementos de los comportamientos estudiados entre los grupos Inc-1, Inc-2 e Inc-3 para toda la población del estudio en su conjunto. Como era de esperar, los perros dedicaron menos tiempo en los comportamientos anormales ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) que en otros comportamientos estudiados, como descanso, locomoción e ingestivo.

Con respecto a los comportamientos anormales se consiguieron valores negativos, siendo -17,0; -6,0 y en -23,08 para Inc-1, Inc-2, e Inc-3, respectivamente, mientras que para los comportamientos de descanso, locomoción e ingestivo se determinaron valores positivos, en los tres períodos (Inc-1, Inc-2, e Inc-3) lo que significa que los perros dedicaron más tiempo a estos comportamientos (TABLA IV). Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) durante el período final del tratamiento en el comportamiento del grupo Trp-2 (TABLA III). Se encontraron incrementos del comportamiento en los grupos Inc-1, Inc-2 e Inc-3 (Inc-1= T-B, Inc-2= F-T e Inc-3=F-B) para toda la población (TABLA IV). No se reportaron efectos secundarios

TABLA III
VALORES MEDIOS DE LOS COMPORTAMIENTOS ESTUDIADOS DE LOS PERROS ALIMENTADOS CON DIETAS QUE CONTENÍAN BAJAS O ALTAS CONCENTRACIONES DE TRIPTÓFANO (TRP-1) Y (TRP-2) ANTES (BASAL), DURANTE (TRATAMIENTO) Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (FINAL)

Periodo	Variable	Trp-1 (n=28)	Trp-2 (n=25)	P-value	
Basal	Anormales	29,8	23,9	0,172	
	Descanso	24,3	30,0	0,183	
	Social	23,7	30,7	0,102	
	Locomoción	26,6	27,4	0,844	
	Ingestivo	26,5	27,6	0,313	
	Otros	27,2	26,7	0,880	
	Cortisol	25,4	28,8	0,441	
	Tratamiento	Anormales	24,1	30,2	0,162
		Descanso	28,8	24,9	0,372
Social		24,6	29,7	0,237	
Locomoción		27,7	26,3	0,749	
Ingestivo		26,2	27,9	0,606	
Otros		25,0	29,2	0,282	
Cortisol		24,5	29,8	0,221	
Final		Anormales	25,2	29,0	0,370
		Descanso	28,7	25,1	0,405
	Social	22,4	32,1	0,023	
	Locomoción	26,4	27,6	0,787	
	Ingestivo	25,1	29,2	0,234	
	Otros	27,2	26,7	0,884	
	Cortisol	29,9	23,7	0,147	

darios en la administración vía oral del triptófano en altas concentraciones en el alimento. Los resultados fueron consistentes con la hipótesis, ya que se observó que la administración de suplementos de triptófano en las dietas de los perros con ansiedad indujo una disminución significativa en los comportamientos relacionados con el estrés conllevando a un aumento de los otros comportamientos que son considerados como normales coincidiendo con lo reportado por otros autores [18, 19, 26, 35]. La administración de suplementos de triptófano aumentó de manera significativa el tiempo dedicado al descanso, observándose esta actitud al final y después del tratamiento; también se comprobó un aumento en el tiempo dedicado a las conductas de locomoción y exploración lo que indica que, aunque el tratamiento aumentó el tiempo de reposo no produjo sedación o letargia y contribuyó a una mayor ingestión de alimentos. En el estudio se observó un valor significativo con respecto al comportamiento de descanso, similar al ya observado por otros autores en especies de producción como el cerdo (*Sus scrofa domestica*) [19,29].

TABLA IV
INCREMENTOS OBTENIDOS PARA CADA UNO DE LOS
COMPORTAMIENTOS ESTUDIADOS Y PARA LOS
NIVELES DE CORTISOL EN HECES EN LOS DIFERENTES
PERÍODOS CONSIDERADOS EN EL ESTUDIO EN LOS
PERROS EVALUADOS (n=53)

	Inc-1		Inc-2		Inc-3	
	m	P-value	m	P-value	m	P-value
Anormales	-17,0	0,0002	-6,0	0,0111	-23,0	0,0001
Descanso	11,3	0,0048	0,3	0,6861	11,7	0,0165
Social	-1,4	0,6841	2,2	0,9076	0,7	0,4967
Locomoción	4,3	0,0007	3,4	0,2899	7,7	0,0029
Ingestivo	0,6	0,0004	1,2	0,0020	1,9	0,0001
Otros	-0,1	0,6635	0,5	0,5640	0,3	0,6597
Cortisol	3,0	0,0522	-0,4	0,6092	2,5	0,0338

m = Media en porcentaje de tiempo; P<0,05.

A pesar de que estos cambios se esperaban para el conjunto de comportamientos estudiados, no se produjeron grandes diferencias en cuanto al comportamiento social en los perros. La información proveniente de estudios con humanos, sugiere que el aumento de la función serotoninérgica puede tener efectos específicos que aumenten el comportamiento social [17] lo que también se comprobó en el presente estudio. Las dietas utilizadas en la presente experiencia, al tener una mayor proporción de triptófano, respecto a los aminoácidos de cadena larga, que la dieta basal, favoreció la disminución de las conductas consecuentes a estados de ansiedad (comportamientos anormales) de los perros estudiados, descritas en la TABLA I. La disminución observada de algunas de estas conductas es coincidente con otros trabajos [10, 19, 30, 37].

Se ha indicado [24] que, las dietas suplementadas con triptófano podrían inducir grandes variaciones en los niveles de serotonina cerebral y pequeños cambios en las respuestas de cortisol al estrés, pero otros autores señalan que la relación entre el estrés y los niveles de cortisol no son siempre directamente proporcional ya que un alto nivel de estrés, puede aumentar, disminuir o no tener efecto alguno sobre los niveles de cortisol [22, 33] lo que podría explicar los resultados no significativos de los niveles de cortisol observados en este estudio. En el presente caso, aunque se incrementó la conducta social, no fue de forma muy evidente, lo que podría explicarse por el hecho de que los perros estaban alojados individualmente y aislados unos de otros. También podría deberse a una falta de interés por socializar por haber sido víctimas de malos tratos antes de ser abandonados en el albergue.

Por último, en este estudio no se encontró correlación entre los niveles de cortisol en heces y los comportamientos estudiados, lo cual se traduce en que, a pesar de haber conseguido mejoras significativas en el comportamiento de los animales con desórdenes de ansiedad por alojamiento en alber-

gues, a los que se les suministró triptófano, no se observó que los valores de cortisol disminuyeron.

CONCLUSIÓN

La administración de suplementos de triptófano contribuyó a reducir el estrés y la ansiedad en los animales del estudio, permitiendo una mayor disposición para el descanso, el juego o la exploración. Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados con el fin de lograr una mejoría en los perros alojados en refugios que sufren estados de ansiedad y son tratados con suplementación de triptófano. Se podrían intentar en un próximo estudio, otras formas de administración del triptófano para obtener una mayor absorción del mismo.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por la Clínica de Comportamiento Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Los autores desean agradecer al Centro de procesamiento de datos de la Universidad Complutense de Madrid por el asesoramiento estadístico, al Centro de Protección Animal del Ayuntamiento de Madrid por permitirnos trabajar en los refugios para animales, y a los veterinarios y el personal que trabaja allí que contribuyeron a este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BEATA, A.; BEAUMONT-GRAFF, E.; DÍAZ, C.; MARION, M.; MASSAL, N.; MARLOIS, N.; MULLER, G.; LEFRA, C. Effects of alpha-casozepine (Zylkene) versus selegiline hydrochloride (Selgian, Anipril) on anxiety disorders in dogs. *J. Of Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 3 (2): 94. 2008.
- [2] BLOKLAND, A.; LIEBEN, C.; DEUTZ, N.E.P. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat. *J. Psychopharmacol.* 16 (1): 39-49. 2002.
- [3] BOINSKY, S.; SWING, S.P.; GROSS, T.S.; DAVIS, J.K. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): behavioural and plasma and faecal cortisol measures of effectiveness. *Am. J. Primatol.* 48:49-68. 1999.
- [4] BOSCH, G.; BEERDA, B.; BEYNEN, A.C.; VAN DER BORG, J.; VAN DER POEL, A.; HENDRIKS, W.H. Dietary tryptophan supplementation in privately owned mildly anxious dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 121:197-205. 2009.
- [5] BOUSOÑO-GARCÍA, M.; SÁIZ, P.A.; GONZÁLEZ, M.P.; BOBES, J. Protocolo diagnóstico de los estados de ansiedad. *Med.* 7(106): 4969-4971. 1999.

- [6] BROUSSET, D.M.; GALINDO, F.; VALDÉZ, R.; ROMANO, M.; SCHUNEMAN, A. Cortisol en orina, saliva y heces: Evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. **Vet. Méx.** 36: 325-337. 2005.
- [7] CLARK, J.D.; RAGER, D.R.; CALPIN, J.P. Animal well-being III. Specific assessment criteria. **Lab. Anim Sci.** 47:586-596. 1997.
- [8] COPPOLA, C.L.; ENNS, R.M.; GRANDIN, T. Noise in the Animal Shelter Environment: Building Design and the Effects of Daily Noise Exposure. **J. of Appl. Anim. Welf. Sci.** 9 (1): 1-7. 2006.
- [9] DAVIS, N.; SCHAFFNER, C.M.; SMITH, T.E. Evidence that zoo visitors influence HPA activity in spider monkeys (*Ateles geoffroyi rufiventris*). **Appl. Anim. Sci.** 90:131-141. 2005.
- [10] DENAPOLI, J.; DODMAN, N.; SHUSTER, L.; RAND, W.; GROSS, K. Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 217:504-508. 2000.
- [11] DE PALMA, C.; VIGGIANO, M.; BARILLARI, E.; PALME, R.; DUFOUR, A.; FANTINI, C.; NATOLI, E. Evaluating the temperament in shelter dogs. **Behav.** 142: 1307-1328. 2005.
- [12] DODMAN, N. H.; REISNER, I.; SHUSTER, L.; RAND, W.; LUESCHER, U.A.; ROBINSON, I.; HOUP, K.A. Effect of dietary protein content on behavior in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 208: 376-379. 1996.
- [13] ECKSTEIN, R.A. Welfare, Well-being, and Pain: Obsessive Compulsive Behaviors. En: **Encyclopedia of Animal Behavior**. M. Bekoff (Ed). Westport: Greenwood Press. Pp 1127-1130. 2004.
- [14] GRAHAM, L.K.; BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biol.** 15: 71-82. 1996.
- [15] HENNESSY, M.B.; DAVIS, H.N.; WILLIAMS, M.T.; MELLOTT, C.; DOUGLAS, CH.W. Plasma Cortisol Levels of Dogs at a County Animal Shelter. **Physiol. Behav.** Vol. 62 (3): 485-490. 1997.
- [16] JANCZAK, A.M.; BAKKEN, M.; BRAASTAD, B. A cautionary note regarding the use of nutritional L-tryptophan to alter aversion-related behaviour mice. **Appl. Ani. Behav. Sci.** 72: 365-373. 2001.
- [17] KING, F. A.; WOLKOWITZ, O.M.; COLE, S.W.; CHAN, T.; MOORE, E.A.; JOHNSON, R.C.; TERPSTRA, J.; TURNER, R.A.; REUS, V.I. Selective alteration of personality and social behaviour by serotonergic intervention. **Am. J. Psychiatry.** 155: 373-379. 1998.
- [18] KOOPMANS, S.J.; RUIS, M.; DEKKER, R.; VAN DIEPEN, H.; KORTE, M.; MROZ, Z. Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. **Physiol. & Behav.** 85: 469-478. 2005.
- [19] LI, Y.Z.; KERR, B.J.; KIDD, M.T.; GONYOU, H.W. Use of supplementary tryptophan to modify the behaviour of pigs. **J. Anim. Sci.** 84:212-220. 2006.
- [20] MALMKVIST, J.; CHRISTENSEN, J. W. A note on the effects of a commercial tryptophan product on horse reactivity. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 107:361-366. 2007.
- [21] MARTIN, P.; BATESON, P. Research desing. **Measuring Behaviour. An Introductory Guide**. 3rd Ed. Cambridge University Press. 187 pp. 2008.
- [22] MEIJER, M.K.; SOMMER, R.; SPRUIJT, B.M.; VAN ZUTPHEN, L.F.; BAUMANS, V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. **Lab. Anim.** 41: 161-173. 2006.
- [23] MENCH, J.A.; SHEA-MORE, M.M. Moods, minds and molecules: the neurochemistry of social behaviour. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 44: 97-100. 1995.
- [24] MEURNIER-SALAÜN, M.C.; MONNIER, M.; COLLEAUX, Y.; SEVE, B.; HENRY, Y. Impact of dietary tryptophan and behavioural type on behaviour, plasma, cortisol, and brain metabolites of young pigs. **J. Anim. Sci.** 69:3689-3698. 1991.
- [25] MOSKOWITZ, D.S.; PINARSS, G.; ZUROFF, D.C.; ANNABLE, L.; YOUNG, S.N. The effect of tryptophan on social interaction in everyday life: A placebo-controlled study. **Neuropsychopharmacol.** 25:277-289. 2001.
- [26] MYINT, A.M.; KIM, Y.; VERKERK, R.; PARK, S.H.; SCHARPÉ S.; STEINBUSH, H.W.M.; LEONARD, B.E. Tryptophan breakdown pathway in bipolar mania. **J. of Affect. Disord.** 102:65-72. 2007.
- [27] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on dog and cat. Requirements of dogs. **Nutrient requirements of dogs and cats**. The National Academies Press. Washington D.C. Pp 98-235. 2006.
- [28] OVERALL, K.L. Fears, anxieties and stereotypes. **Clinical behavioral medicine for small animals**. Mosby-Year Book Inc.; St Louis. Pp 209-250. 1997.
- [29] PEETERS, E.; DRIESEN, B.; STEEGMANS, R.; HENOT, D.; GEERS, R. Effect of supplemental tryptophan, vitamen E, and herbal product on responses by pigs to vibration. **J. Anim. Sci.** 82: 2410-2420. 2004.
- [30] ROUVINEN, K.; ARCHBOLD, SH.; LAFFIN, S.H.; HARRI, M. Long-term effects of tryptophan on behavioural response and growing-furring performance in silver

- fox (*Vulpes vulpes*). **Appl. Anim. Behav. Sci.** 63:65-77. 1999.
- [31] SAPOLSKY, R.A. Stress. **Why zebras don't get ulcers**. 3rd Ed. Henry Holt and Company. LLC: New York. Pp 6-12. 2004.
- [32] SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluation adrenocortical function. **Vet. Res. Com.** 25: 271-287. 2001.
- [33] SMITH, T.E. Uses and abuses of non-invasive hormone analysis to monitor stress in zoo animals. **Proceedings of the 3rd Annual Symposium on Zoo Research**. A. Plowman (Ed.) Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland. Pp 201-205. 1999.
- [34] UCHIDA, S.; KITAMOTO, A.; UMEEDA, H.; NAKAGAWA, N.; MASUSHIGE, S.; KIDA, S. Chronic reduction in dietary tryptophan leads to changes in the emotional response to stress in mice. **J. Nutri. Sci. Vitaminol.** 51 (3): 175-181. 2005.
- [35] VAN HIERDEN, Y.M.; KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M. Chronic increase of dietary L-tryptophan decreases gentle feather pecking behaviour. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 89: 71-84. 2004.
- [36] WHITTEN, P.L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSELL, E. Response of faecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Am. J. Primatol.** 44: 57-69. 1998.
- [37] WURTMAN, R.J.; FERNSTROM, J.D. Control of brain monoamine synthesis by diet and amino acids. **Am. J. Clin. Nutr.** 28: 638-647. 1975.
- [38] WURTMAN, R.J. Ways that foods can affect the brain. **Nutr. Rev.** 44 (Supplement 3):2-6. 1986.
- [39] YOUNG, K.M.; WALKER, S.L.; LANTHIER, C.; WADDEL, W.T.; MONFORT, S.L.; BROWN, J.L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **Gen. Compar. Endocrinol.** 137: 148-165. 2004.
- [40] ZHANG, L.; GUADARRAMA, L.; CORONA-MORALES, A.A.; VEGA-GONZALEZ, A.; ROCHA, L.; ESCOBAR, A. Rats subjected to extended L-tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes. **J. Neuropathol. Experim. Neurol.** 65 (6): 562-570. 2006.