

Effetto sull'emissione fecale del cane di due diete a diversi livelli di carboidrati ed origine proteica e possibili effetti sul comportamento

RIASSUNTO

Introduzione e scopo del lavoro - Il presente studio ha messo a confronto due diete per cani, pari per contenuto energetico e proteico ma di differente origine proteica e percentuale di carboidrati: la prima (D1) a base di proteine vegetali e ricca in carboidrati e la seconda (D2) a base di proteine animali e minori percentuali di carboidrati. Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'impatto delle due diverse diete sulla massa fecale prodotta ed evidenziare eventuali effetti comportamentali dei due regimi alimentari.

Materiali e metodi - Per la prova sono stati utilizzati 20 cani: 10 maschi e 10 femmine, risultati in buono stato di salute fisica e privi di disturbi comportamentali. La prova ha avuto una durata di 40 giorni, al termine dei quali i soggetti sono stati sottoposti a 9 test comportamentali. Le conseguenti reazioni, valutate da due medici veterinari esperti in comportamento, secondo le Linee Guida FNOVI (Pubblicità Sanitaria: linee guida inerenti l'applicazione dell'art. 54 del Codice Deontologico; Appendice - Medicina veterinaria Comportamentale e Medicine non Convenzionali Veterinarie, gennaio 2009), sono state classificate come comportamento di quiete o comportamento reattivo.

Risultati e discussione - I soggetti alimentati con la D1 hanno dimostrato un incremento significativo della loro emissione fecale giornaliera con feci più molli e meno conformate. Dal punto di vista comportamentale, nonostante l'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi, è da registrare una generale tendenza all'ipereccitabilità nella risposta ad alcuni stimoli dei soggetti alimentati con dieta a prevalente apporto di proteine animali e bassa percentuale di carboidrati.

INTRODUZIONE

È ormai evidente l'influenza dell'alimentazione sulla salute dell'organismo animale, come fattore preventivo e terapeutico nei confronti di molte patologie. Diversi studi hanno evidenziato le azioni che alcuni alimenti possono esercitare sull'organismo non solo nei confronti della salute ma anche sull'equilibrio psico-fisico, delineando una relazione diretta tra alimentazione e comportamento animale. Oltre alle influenze tossiche di prodotti di fermentazione o trasformazione degli alimenti, sono state dimostrate attività farmacologiche di prodotti endorfino-simili, derivanti dalla digestione di alcuni componenti alimentari come la caseina ed il glutine^{1,2,3,4}. Relativamente più recenti sono le informazioni circa le attività extranutrizionali degli alimenti⁵, principalmente legate ai processi digestivi, di trasformazione e utilizzo di alcuni componenti alimentari come gli antiossidanti^{6,7} o nella formazione di peptidi biologicamente attivi, capaci di influenzare la capacità di apprendimento^{8,9} o la risposta aggressiva negli animali^{10,11,12,13,14,15}. In tal senso tutti gli studi sono concordi nel riconoscere alla frazione proteica della dieta le maggiori influenze, legate perlopiù alla presenza costitutiva di aminoacidi come il triptofano, precursore essenziale nella sintesi di serotonina. La serotonina è un neurotrasmettitore implicato negli stati d'animo di benessere e di sazietà¹⁰. Bassi livelli di serotonina sono stati correlati a stati d'animo negativi e ad aggressività in di-

D. Gatta¹, L. Casini², O. Pellegrini³,
G. Lubas⁴, A. Gazzano⁵

¹ Laureato in Scienze e tecniche delle produzioni animali, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa, Italy

² DVM, PhD, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa, Italy

³ DVM libero professionista

⁴ DVM Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa, Italy

⁵ DVM, PhD, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa, Italy

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 04/06/2013 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 17/09/2013".

versi studi^{13,16,17}. Pur con risultati differenti sono stati valutati nel cane gli effetti di diete a diverso tenore proteico, semplici o con aggiunta di integrazioni di triptofano^{10,12,18}. Da qui alcune ricerche hanno concluso che una dieta a basso tenore proteico può essere di aiuto nella gestione di animali con aggressività territoriale quando sia presente una componente di paura^{10,12}. Di grande importanza, anche se meno indagato nel cane, è il ruolo dei carboidrati presenti nella dieta, per le variazioni che i livelli insulinici possono determinare nell'utilizzo degli aminoacidi stessi da parte del SNC^{5,19,20,21}.

Scopo del presente studio è stato quello di comparare due diete isoproteiche e isoenergetiche ma contenenti diverse fonti proteiche e diverse percentuali di carboidrati: la prima a base di proteine vegetali e ricca in carboidrati, la seconda a base di proteine animali e minor percentuale di carboidrati, e di valutare i loro effetti sull'emissione fecale e le eventuali ripercussioni sul comportamento del cane.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 20 cani meticci, interi (10 maschi e 10 femmine non in fase estrale) di età compresa fra 1 e 7 anni e peso tra 10 e 30 kg. I soggetti erano ospitati da almeno 2 mesi, in box singoli, in un canile rifugio della provincia di Pisa, alimentati con dieta standard e sotto-

posti a visita clinica e comportamentale e ad esami di laboratorio (esame delle feci, esame emocromocitometrico con formula, esami di funzionalità epatica e renale), risultando sani. Dal punto di vista comportamentale gli animali, osservati precedentemente nel proprio box, non presentavano stereotipie né iperattività; tutti i soggetti non presentavano reazioni di timore nei confronti di estranei che si avvicinavano al box, manifestando un comportamento non aggressivo. I cani sono stati quindi suddivisi in due gruppi di 10, omogenei per taglia, sesso, età, peso. Il primo gruppo è stato alimentato con una razione a prevalente apporto proteico vegetale (93% delle proteine totali di origine vegetale) costituito da mangime con l'aggiunta di farina di estrazione di soia (dieta 1). La farina di soia era amalgamata al mangime tramite aggiunta di acqua al fine di ottimizzarne l'appetibilità. Il secondo gruppo, invece, è stato alimentato con un mangime (dieta 2) a prevalente apporto di proteine animali (80% delle proteine totali). La composizione e le caratteristiche delle diete sono riportati in Tabella 1. Il razionamento è stato compiuto secondo i fabbisogni stabiliti dall'NRC²² in modo da fornire, con entrambe le diete, analoghe dosi di proteine ed energia, tali da coprire i fabbisogni degli animali (Tabella 2). La prova ha avuto una durata complessiva di 40 giorni. Gli animali sono stati mantenuti in box singoli per tutta la durata della prova. Sono stati inoltre pesati all'inizio ed al termine della prova.

A partire dal 30° giorno di sperimentazione, sono state raccolte quotidianamente le feci dei cani e valutate le loro caratteristiche visive secondo una scala da 1 a 5 (1 = feci molto indurite, 2 = feci solide e conformate, 3 = feci morbide e conformate, 4 = feci molli e non conformate 5 = feci liquide). Tutti i campioni fecali sono stati inoltre analizzati in laboratorio per determinare l'effettivo contenuto di umidità²⁴. I campioni dei mangimi utilizzati sono stati analizzati presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze Veterinarie.

Al termine del periodo sperimentale, gli animali sono stati sottoposti una sola volta, per evitare possibili fenomeni di abitudine o sensibilizzazione, a 9 test comportamentali, descritti in Tabella 3, al fine di valutare il loro grado di reattività. Tutti i test si sono svolti nel box in cui il cane era ospitato, sono stati eseguiti sempre dagli stessi operatori e sono stati filmati con videocamera digitale per permettere un'adeguata valutazione delle reazioni dell'animale.

Il comportamento dell'animale è stato valutato da due medici veterinari, esperti in comportamento animale, che avevano compiuto un periodo di training in modo che la loro valutazione del comportamento dell'animale non differisse per un valore superiore al 10%. Ogni esaminatore ha valutato il comportamento di 10 cani, 5 del primo gruppo e

TABELLA 1
Composizione chimica e valore nutritivo degli alimenti somministrati (%/ss)

	Dieta 1	Dieta 2
Umidità	8,5	8,6
Proteine	29	29,8
Grassi	14,5	27,2
Fibra grezza	4,6	3,1
Ceneri	5,0	16,8
Carboidrati	46,9	23,1
Energia metabolizzabile (kcal/kg SS)	3889	4163

TABELLA 2
Quantità somministrate (g/capo/die per un peso medio di 20 kg)

	Dieta 1	Dieta 2
Sostanza secca	321	300
Tal quale	351	328
Proteine grezze	93	89
Energia Metabolizzabile (kcal)*	1249	1249

* $132 \times (PV)^{0,75}$.

TABELLA 3
Test comportamentali

Test	Tipo di test	Descrizione del test
1	Manipolazione	Il cane era sottoposto ad una manipolazione da parte di una persona sconosciuta che toccava l'animale in tutte le parti del corpo, sempre con la medesima intensità ed ordine (prima dorso, poi torace, poi orecchie etc), parlando all'animale con tono pacato.
2	Stimolo visivo	Una foto con il flash era scattata di fronte al cane ad una distanza di due metri dall'animale.
3	Stimolo acustico	Un unico fischio era emesso con un fischietto da arbitro.
4	Movimento improvviso	Appena catturata l'attenzione del cane, l'operatore, sconosciuto al cane e inginocchiato di fronte ad esso, si alzava di scatto aprendo le braccia.
5	Camice bianco	Mentre il primo operatore non conosciuto dal cane catturava l'attenzione dell'animale, un secondo operatore con un camice bianco entrava nel campo visivo dell'animale e si poneva di fronte ad esso.
6	Avvicinamento di persona sconosciuta	Mentre il primo operatore non conosciuto dal cane attirava la sua attenzione, un secondo operatore, sconosciuto all'animale, entrava nel campo visivo del cane e gli si avvicinava a passo normale con una traiettoria rettilinea.
7	Avvicinamento di conspecifico dello stesso sesso	In due gabbie di rete adiacenti di dimensioni di 1m x 1m, alte 80 cm, erano collocati il cane da testare ed un cane sconosciuto dello stesso sesso. La gabbia contenente il cane "tester" era coperta da un panno che era sollevato per 30 secondi per permetterne la vista all'altro cane.
8	Avvicinamento di conspecifico di sesso opposto	In due gabbie di rete adiacenti di dimensioni di 1m x 1m erano collocati il cane da testare ed un cane sconosciuto di sesso opposto. La gabbia contenente il cane "tester" era coperta da un panno che era sollevato per 30 secondi per permetterne la vista all'altro cane.
9	Reazione di fronte ad un gatto	In due gabbie di rete adiacenti di dimensioni di 1m x 1m erano collocati il cane da testare ed un gatto sconosciuto al cane. La gabbia contenente il gatto era coperta da un panno che era sollevato per 30 secondi per permettere la vista dell'animale al cane.

5 del secondo gruppo, senza conoscere il gruppo di appartenenza dell'animale.

In tutti i test, il comportamento del cane è stato classificato come: "Comportamento di calma" se l'animale si mostrava indifferente allo stimolo o esibiva un atteggiamento giocoso e "Comportamento reattivo" se il cane mostrava segni di paura (evitamento o freezing) o di aggressività, prescindendo dall'intensità dei comportamenti manifestati ma valutando la presenza o meno del comportamento, come precedentemente riportato da Dowling-Guyer et al²⁵.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica, utilizzando ANOVA e il test del χ^2 (JMP-SAS)²⁶.

RISULTATI

Tutti i cani hanno completato lo studio. Le caratteristiche delle feci hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (Tabella 4). In particolare i soggetti alimentati con la dieta 1 hanno mostrato un incremento della loro emissione fecale giornaliera con feci più molli e meno conformate. Per quanto riguarda l'aspetto comportamentale, nonostante un generale incremento della reattività in risposta agli stimoli nei soggetti alimentati con la dieta 2 (a prevalente apporto di proteine animali e ridotta percentuale di carboidrati) non sono state rilevate diffe-

TABELLA 4
Caratteristiche delle feci prodotte (media \pm DS)

	Dieta 1	Dieta 2
Sostanza secca %	23,18 ^a \pm 5,07	31,83 ^b \pm 2,55
Punteggio	3,50 ^a \pm 0,34	2,64 ^b \pm 0,41

^{a,b} p<0,01.

renze statisticamente significative tra i due gruppi in relazione al comportamento (Tabella 5). In particolare mostra una reattività maggiore, che sfiora la significatività, un numero più elevato di animali alimentati con la dieta 2 nel test del "Flash", in quello de "Vista del gatto" e nella prova di "Moto improvviso".

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti indicano come le due diete si differenzino per le caratteristiche delle feci prodotte: nei soggetti alimentati con la dieta 1 si è manifestato un significativo aumento dell'emissione quotidiana di feci che apparivano anche di consistenza ridotta rispetto al gruppo alimentato con dieta 2. Probabilmente tale risultato è legato alla maggiore quota di fibra presente nella dieta 1. Questo incremento dell'emissione quotidiana

TABELLA 5
Percentuale di soggetti che hanno mostrato un “comportamento reattivo” e un “comportamento di calma totale” nei diversi test comportamentali

Stimoli	Dieta 1		Dieta 2		p
	% di soggetti con comportamento reattivo	% di soggetti con comportamento di calma	% di soggetti con comportamento reattivo	% di soggetti con comportamento di calma	
Manipolazione	30%	70%	10%	90%	n.s.
Flash	20%	80%	60%	40%	0,067
Fischio	0%	100%	10%	90%	n.s.
Moto improvviso	70%	30%	100%	0%	0,060
Vista gatto	30%	70%	70%	30%	0,070
Uomo con camice	40%	60%	40%	60%	n.s.
Persona ignota	50%	50%	70%	30%	n.s.
Cane stesso sesso	20%	80%	40%	60%	n.s.
Cane altro sesso	10%	90%	20%	80%	n.s.

n.s. = Differenza statisticamente non significativa.

delle feci, unitamente alla loro minor consistenza può risultare problematico nella gestione familiare del cane. Nella società attuale sono sempre più numerosi gli animali che vivono in appartamento e che hanno un accesso limitato all'esterno per espletare le loro funzioni organiche. È consuetudine consigliare ai proprietari di permettere all'animale di uscire all'aperto almeno 4 volte nell'arco della giornata, distanziando le uscite di 4-5 ore tra di loro. Diete che aumentino l'emissione quotidiana delle feci o ne riducano la consistenza possono, perciò, non incontrare il favore del proprietario, che potrebbe essere costretto ad intensificare le uscite col proprio animale. È d'altronde importante sottolineare come la dieta 1, contenente un'alta percentuale di proteine vegetali, sia ben tollerata dagli animali e possa costituire un'alternativa “etica” per quei proprietari che per religione o “credo” personale siano restii al consumo di carne anche da parte del proprio animale.

Per quanto riguarda l'aspetto comportamentale, i risultati non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi. Pur non potendo escludere l'assenza di una correlazione tra dieta e comportamento, i valori statistici, in alcuni casi molto prossimi alla significatività, inducono a formulare possibili ipotesi da verificare con successive ricerche. Una prima possibile spiegazione, può risiedere nel numero ridotto di soggetti e/o nel tempo limitato di somministrazione, troppo breve per provocare effetti consistenti sul comportamento. Per quanto ulteriori prove saranno necessarie per verificare queste ipotesi, è da sottolineare come gli animali alimentati con la dieta 2, con prevalente apporto di proteine animali e ridotta percentuale di carboidrati, abbiano eviden-

ziato una generale disposizione all'ipereccitabilità in risposta ad alcuni stimoli, rispetto al gruppo alimentato con la dieta 1. Tale dato è in accordo con quanto riportato in bibliografia. La serotonina infatti, che riconosce nel triptofano il suo precursore biochimico, svolge un effetto inibitorio nei confronti del centro ipotalamico dell'aggressività. Ciononostante una dieta molto ricca in proteine può provocare, per effetto paradossale²¹, una ridotta penetrazione del triptofano attraverso la barriera emato-encefalica^{27,28} a causa dall'aumentata presenza nel circolo di altri aminoacidi e dell'azione competitiva che questi esercitano verso i medesimi carrier.

Le differenze evidenziate nei due gruppi (con aumento dell'eccitabilità nel gruppo alimentato con proteine animali) difficilmente possono essere imputate alla diversa qualità delle proteine o alla quota proteica della dieta. I fabbisogni proteici e l'apporto di aminoacidi risultavano infatti ampiamente coperti e la percentuale in proteine della dieta 2 risultava uguale a quella della dieta 1. Il contenuto in triptofano risultava inoltre potenzialmente superiore nella dieta 2, data la maggiore quantità di questo aminoacido che le proteine animali presentano rispetto alle proteine vegetali. Già precedenti studi²⁹ hanno dimostrato come l'integrazione di triptofano alla dieta non sia di per sé sufficiente a modificare il comportamento del cane.

Inoltre non possiamo escludere che la differente composizione aminoacidica delle proteine presenti nelle due diete possa incidere sull'effettivo assorbimento del triptofano, con fenomeni di competizione più spiccata per i carrier di trasporto in un caso piuttosto che nell'altro.

La differenza evidenziata tra le risposte ai due trattamenti potrebbe essere addebitata alla diver-

sa percentuale di carboidrati delle due diete. Infatti nella dieta a base di proteine animali la quota di carboidrati era pari al 23,1%, mentre nell'altra raggiungeva il 46,9%. Elevate quantità di carboidrati nella dieta stimolano infatti l'innalzamento di insulina e consentono la rimozione della maggior parte dei GAEN (Grandi Aminoacidi Elettricamente Neutri) dal circolo sanguigno. Tale meccanismo non interferisce però sul triptofano, che può quindi penetrare in maggior quantità nel sistema nervoso centrale, determinando un aumento della sintesi di serotonina con conseguente effetto calmante^{10,30,31}.

È in quest'ottica che possono essere interpretati i risultati ottenuti e, in particolare, le risposte agli stimoli: flash ($p=0,067$), movimento improvviso ($p=0,060$) e vista di un gatto ($p=0,070$), che mostrano differenze al limite della significatività nel comportamento tra i due gruppi e suggeriscono la probabile influenza della dieta ricca in carboidrati sulla diminuzione dei comportamenti reattivi del cane.

Non si può peraltro escludere che l'effetto calmante della dieta 1 sia legato all'alto tenore di fibra presente e che potrebbe indurre un maggior senso di sazietà nell'animale con conseguente riduzione della sua reattività e ciò in accordo con quanto dimostrato sempre da Bosch e colleghi³² utilizzando due diete con contenuto di fibre a diversa fermentescibilità.

Un'ultima ipotesi da prendere in considerazione è che, alla base della maggior tendenza alla reattività nei soggetti alimentati con la dieta 2, vi sia un effetto legato al diverso contenuto in grassi. Al di là del mero computo matematico delle calorie infatti, si può ipotizzare una maggiore digeribilità della dieta 2, dimostrato indirettamente da una significativa ridotta emissione fecale, e quindi una maggiore efficienza dell'energia fornita.

Il cane tra tutti gli animali domestici è quello che gode di un rapporto privilegiato con l'essere umano, per l'elevata capacità che ha di sviluppare un legame di attaccamento con esso^{33,34}. L'attenzione alle possibilità di modificare il suo comportamento è sempre stata quindi molto elevata, oltre che per le notevoli implicazioni che ciò avrebbe sul rapporto di questo animale anche per ottenere performance sempre migliori e permettere al cane di superare situazioni stressanti, favorendone un corretto sviluppo emozionale³⁵. La manipolazione dietetica è sicuramente una delle possibilità più interessanti per operare una modificazione comportamentale, anche per la facilità con cui il proprietario può attuarla. Tuttavia, gli effetti delle diverse sostanze nell'organi-

smo sono ancora, per alcuni aspetti, non perfettamente chiariti e saranno necessarie ulteriori e più approfondite ricerche per poter mettere a punto diete che possano agire efficacemente nel modificare aspetti indesiderati e, a volte, pericolosi del comportamento del cane, favorendo un miglior inserimento di questo animale nella società umana. È questo il significato della presente ricerca i cui risultati hanno permesso di formulare una serie di ipotesi che richiederanno ulteriori approfondimenti.

Parole chiave

Reattività, proteine animali, proteine vegetali, comportamento, dieta, cane.

Effect on dog faeces emission of two diets with different dietary protein sources and carbohydrates content and possible effect on behaviour

Summary

Introduction and aim of the work - This prospective controlled study was performed to compare two isoenergetic and isonitrogenous diets for dogs: the former (D1) was based on vegetable proteins and rich in carbohydrates, the latter (D2) was based on animal proteins and a lower percentage of carbohydrates. The aim of the research has been to evaluate the effect on fecal consistency and to highlight the possible effects on dog behavior.

Materials and methods - Twenty dogs, 10 males and 10 females, were enrolled after a careful history, clinical examination and laboratory exams, confirming their good health status and lack of evident behavioural disorders.

Dogs were fed each diet for 40 days at the end of whom 9 behavioral tests were performed. The behavioural reactions were evaluated by two expert behaviourist veterinarians and divided in two levels: calm and reactive behavior.

Results and discussion - The subjects fed D1 showed a significant increase in fecal emission. Although in absence of statistical significant difference results between the two groups of dogs a general trend to hyperexcitability in subjects fed on diet with prevailing animal protein and reduced carbohydrate content was observed.

Key words

Reactive responses, animal protein, vegetable proteins, behaviour, diet, dog.

BIBLIOGRAFIA

1. Saito T., Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606:295-317, 2008.
2. Teschermacher H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16):1331-44, 2003.
3. Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, 43(2):129-344, 1997.
4. Hemmings W.A. The entry into the brain of large molecules derived from dietary protein, In: *Proceedings of the Royal Society of London Series, Containing Paper of Biological character*, 1978, (Royal Society Great Britain), 1139:175-192, 1978.
5. Ballarini G.. *Psicodietetica animale*. *Veterinaria*, 2:113-12, 1989.
6. Milgram W.N., Head E., Cotman C. The effects of antioxidant fortified food and cognitive enrichment in dogs. In: *Symposium on Brain Aging and Related Behavioural Changes in Dogs (Veterinary Health Care Communications Orlando, Lenexa KS)*; 31-33, 2002.
7. Milgram, N. W., Head, E., Zicker et al Long-term treatment with antioxidants and a program of behavioural enrichment reduces age-dependent impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Experimental Gerontology*, 39:753-765, 2004.
8. Kelley R., Lepin A. Improving puppy trainability through nutrition. In *Proc. Iams Clinical Nutrition Symposium*, (Seville, Spain) 28-33, 2005.
9. Flood J.F., Smith G.E., Morley J.E. Modulation of memory processing by cholecystokinin: dependence on the vagus nerve. *Science*, 236:832-83, 1987.
10. Houpt KA, Zicker S. Dietary effects on canine and feline behaviour. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*; 33:405-416, 2003.
11. De Napoli J.S., Dodman N.H., Shuster L. et al. Effect of dietary protein content and Tryptophane supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 217:504-508, 2000.
12. Dodman N.H., Reisner I., Shuster L. et al. Effect of dietary content on behaviour in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 376-379, 1996.
13. Mehlman P.T., Higley J.D., Faucher I. et al. Low CDF 5-HIAA concentrations and severe aggression and impaired impulse control in nonhuman primates. *American Journal of Psychiatry*, 151:1485-1491, 1994.
14. Gietzen D.W., Duke C.M., Hammer V.A. Amino acid imbalance, a nutritional model: Serotonin3 mediation of aversive responses. *Physiology and Behavior*, 49:981-985, 1991.
15. Shea M.M., Douglass L.W., Mench J.A. The interaction of dominance status and supplemental Tryptophan on aggression in *Gallus domesticus* males. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 38:587-59, 1991.
16. Reisner I.R., Mann J.J., Stanley M. et al. Comparison of cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels in dominant-aggressive and non-aggressive dogs. *Brain Research*, 714:57-64, 1996.
17. Miller H.L., Delgado P.L., Salomon R.M. et al. Acute tryptophan depletion: a method of studying antidepressant action. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 53:28-35, 1992.
18. Campbell W.E. Nutrition and behaviour. In: P.W. Pratt, (eds), *Behaviour problems in dogs* Goleta, Ca., (American Veterinary Publications Inc), 1992, 147-149.
19. Takeda E., Terao J., Nakaya Y. et al. Stress control and human nutrition. *The Journal of Medical Investigation* 3-4:139-145, 2004.
20. Markus C.R., Panhuysen G., Tuiten A. et al. Does carbohydrate-rich, protein-poor food prevent a deterioration of mood and cognitive performance of stress-prone subjects when subjected to a stressful task? *Appetite*, 31:49-65, 1998.
21. Wurtman R.J. 1986. Ways that foods can affect the brain. *Nutrition Reviews*, 44(suppl): 2-6.
22. National Research Council. 1985. *Nutrient Requirements of Dogs Revised 1985*. National Academy Press (Washington, DC).
23. Abrantes R.A.B. 1987. The expression of emotions in man and canid. *Journal of Small Animal Practice*, 28:1030-1036.
24. AOAC. 1985. *Official Methods of Analysis*. 14th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington, DC.
25. Dowling-Guyer S., Marder A., D'Arpino S. Behavioural traits detected in shelter dogs by a behavior evaluation. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 130, 107-114, 2011.
26. JMP. 2002. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
27. Byork J.M., Dougherty D.M., Moeller F.G. et al. The effects of tryptophan depletion and loading on laboratory aggression in men: time course and a food restricted control. *Psychopharmacology*, 142:24-30, 1999.
28. Sarwar G., Botting H.G., Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *The Journal of Nutrition*, 129:1692-1697, 1999.
29. Bosch G., Beerda B., Beynen A. et al. Deitary tryptophan supplementation in privately owned mildly anxious dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 121, 197-205, 2009.
30. Fernstrom J.D.. Dietary effects on brain serotonin synthesis: relationship to appetite regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42(suppl 5):1072-1082, 1985.
31. Fernstrom M.H., Volk E.A. Fernstrom J.D. In vivo inhibition of tyrosine uptake into rat retina by larger neutral but not acidic amino acids. *The American Journal of Physiology*, 251:E393-E399, 1986.
32. Bosch G., Beerda B., Van de Hoek E. et al. Effect of dietary fibre type on physical activity and behaviour in kennelled dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 121, 32-41, 2009.
33. Mariti C., Ricci E., Carlone B. et al. Dog attachment to man: A comparison between pet and working dogs. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.*, 8, 135-145, 2013.
34. Ricci E., Mariti C., Carlone B. et al. Does the breed influence dog's attachment to man? a preliminary study. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.*, 6, 91, 2011.