LUCAS DOMÊNICO ELMÔR

Suplementação de triptofano na atividade elétrica cerebral e glicemia de cães da raça Pit Bull.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa

Pirassununga

2009

Ao meu pai **José**, mãe **Maísa** e irmão **Franco** que cada um a sua maneira contribuiu para o desenvolvimento de meu caráter.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa, por ter me acolhido em uma hora difícil, pela sua paciência e principalmente pela amizade e ótima convivência.

Aos cães Buddy, Bryan e especialmente pelo Thunder. Sem eles esta investigação não teria sido feito.

À Prof. Dra. Catarina Abdalla Gomide pelo apoio, incentivo e amizade.

À minha grande amiga Patrícia Fernanda de Almeida Fernandes pelo incentivo, inspiração, conselhos e pela ajuda no inglês.

Ao meu grande amigo Rodrigo da Costa Gomes pelo apoio e auxílio na confecção de todas as etapas deste trabalho.

Ao técnico do LAFAC, Aldo Ivan Céspedes Arce, pela ajuda em todas as etapas do projeto e pela amizade.

À Rosana Ferrari pela ajuda no desenvolvimento do protocolo experimental e pela amizade.

Aos Professores Doutores Júlio Balieiro e Saulo da Luz pelo auxílio na estatística.

Ao Alexandre Rossi pelo apoio, incentivo e por compartilhar comigo seus conhecimentos.

Ao Marcos Vansan pela utilização do canil de sua empresa e pelo fornecimento de alguns animais.

Aos funcionários do Canil da empresa CEPAC que auxiliaram durante a experimentação.

Aos estagiários Siri e Batata que muito me ajudaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos grandes amigos Guilherme, Lidianne, Pedro, Marcio, Samuel, Henrique, César, Tiago e Gustavo pelo apoio nas horas mais difíceis.

Ao amigo Dr. Rodrigo Bazolli pelo auxílio.

Aos amigos do LAFAC, Kathleen, Adriano, Carol, Daniele, Fabrício, Gabriel, Gustavo e Max pelo apoio e companheirismo.

Aos funcionários e amigos da Biblioteca da FZEA – USP.

Aos colegas da pós – graduação.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ELMOR, L.D. **Suplementação de triptofano na atividade elétrica cerebral e glicemia de cães da raça Pit Bull**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Três cães machos adultos da raça Pit Bull foram utilizados com o intuito de avaliar o efeito da suplementação de triptofano na atividade elétrica cerebral e taxa glicêmica. Os tratamentos foram: A) Dieta base + veículo com placebo (controle); B) Dieta base + veículo com 1,11g de triptofano. Inicialmente os animais passaram por doze dias de fornecimento do tratamento A, destes, cinco dias foram destinados a colheita dos dados. Após três dias de descanso teve início o período de 12 dias de fornecimento do tratamento B, com o aumento de um dia de colheita. Para a colheita de EEG foi utilizado o registro bipolar, sendo o sinal colhido numa frequência de amostragem de 120 Hz por um período de 20 minutos por dia de colheita. Utilizou-se um glicosímetro portátil para mensurar a glicemia nos tempos 0, 15, 30, 45 minutos, relacionados com o período destinado ao manejo de colheita de EEG. A suplementação de triptofano diminuiu a energia das bandas de frequências beta, teta, alfa e delta, permitindo sugerir uma modificação na atividade elétrica cerebral. Não houve efeito significativo do fornecimento de triptofano suplementar sobre a glicemia dos cães utilizados neste experimento.

Palavras – Chave: Curva glicêmica, Estresse, Nutrição de Cães, Processamento digital de sinais.

ABSTRACT

ELMOR, L.D. **Tryptophan supplementation on brain electrical activity and blood glucose in Pit Bulls Dogs**. 2009. 81 p. Dissertation (Mastering Course) – College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2009.

Three adults male Pit Bulls dogs were housed with the intention of evaluating the effects of tryptophan supplementation on brain electrical activity and glicemic curve. The treatments were: A) Basic Diet + Placebo (control); B) Basic Diet + 1,11 g of tryptophan. First the animals were kept for 12 days using the A treatment, with five days of data collecting. After three days off they were kept for 12 days using the B treatment, but with an addition of one day of data collecting. The EEG collecting was made using a bipolar register, and the signal was collected on a 120 Hz sampling frequency for 20 minutes per collecting day. The blood glucose was measured using a portable blood glucose meter on 0, 15, 30 and 45 minutes, related to the EEG collecting period. The Tryptophan supplementation decreased the energy signals of the beta, theta, alpha and delta frequencies, which suggests some modification on the brain electrical activity. There was no effect of the tryptophan supplementation on the glicemic curve.

Key – Words: Digital Signals Processing, Dog nutrition, Glicemic curve, Stress.

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1 – Proteína Transportadora de aminoácidos neutros grandes.....	7
Figura 2 – Metabolismo do Triptofano no sistema nervoso central.....	9
Figura 3 – Baia do Canil.....	18
Figura 4 – Comedouro e bebedouro.....	18
Figura 5 – Baias voltadas para a mesma direção.....	18
Figura 6 – Área de lazer (Vista frontal).....	19
Figura 7 – Área de lazer (Vista lateral).....	19
Figura 8 – Piscina própria para cães.....	20
Figura 9 – Globo Negro e “Data Logger” para mensuração de temperatura e umidade.....	28
Figura 10 – Módulo 1.....	29
Figura 11 – Módulo 1(componentes).....	29
Figura 12 – Módulo 2.....	30
Figura 13 – Tela principal do software.....	30
Figura 14 – Eletrodos de superfície.....	31
Figura 15 – Eletrodos posicionados no animal.....	32
Figura 16 – Posicionamento dos eletrodos na cabeça do animal.....	33
Figura 17 – Punção na orelha.....	34
Figura 18 – Colheita do sangue.....	34
Figura 19 – Espera do Resultado.....	35
Figura 20 – Espectro de frequência do sinal captado.....	38
Figura 21 – Registro de EEG adquirido de um cão recebendo veículo	

mais placebo na amostragem de 120 Hz.....	39
Figura 22 – Registro de EEG adquirido de um cão recebendo veículo mais triptofano na amostragem de 120 Hz.....	39
Figura 23 – Gráfico do sinal de EEG de 3s de um cão recebendo veículo mais placebo.....	40
Figura 24 – Gráfico do sinal de EEG de 3s de um cão recebendo veículo mais triptofano.....	41
Figura 25 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	42
Figura 26 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	42
Figura 27 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	43
Figura 28 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	44
Figura 29 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 2 sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	44
Figura 30 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	45

Figura 31 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	46
Figura 32 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	47
Figura 33 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	47
Figura 34 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	48
Figura 35 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	49
Figura 36 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.....	49
Figura 37 – Variação média da curva glicêmica, em mg/dl, durante o tempo, em minutos.....	37
Figura 38 – Valor médio da glicemia, em mg/dl, durante os dias de mensuração.....	51
Figura 39 – Média geral para a glicemia nos diferentes tratamentos alimentares, em mg/dl.....	52

LISTA DE TABELAS

	Pg.
Tabela 1 – Níveis de garantia da dieta base segundo o fabricante.....	22
Tabela 2 – Resultado da análise bromatológica.....	23
Tabela 3 – Perfil Aminoacídico da dieta base.....	24
Tabela 4 – Valores médios de temperatura do ar e umidade relativa por baía por período.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μV^2	Micro volts quadrados
AECB	Atividade Elétrica Cerebral de Base
ANG	Aminoácidos Grandes Neutros
API	Aplication Program Interface
CDE	Coeficiente de Digestibilidade Estimada
cm	Centímetros
dl	Decilitro
EB	Energia Bruta
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EEG	Eletroencefalograma
EM	Energia Metabolizável
ENN	Extrato não Nitrogenado
FB	Fibra Bruta
FFT	Fast Fourier Transform
g	Grama
Hz	Hertz
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
m	Metros
m^2	Metros quadrados
Máx	Máximo
Mín	Mínimo
MM	Matéria Mineral

mm	Milímetros
PB	Proteína Bruta
PV	Peso Vivo
s	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

	Pg.
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL.....	3
2.1 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 Eletroencefalograma.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Local do experimento.....	17
4.2 Animais.....	20
4.3 Manejo diário dos animais.....	21
4.4 Tratamentos.....	21
4.5 Procedimento experimental.....	26
4.5.1 Aquisição de sinal cerebral.....	28
4.5.1.1 Equipamento.....	28
4.5.1.2 Metodologia.....	30
4.5.1.3 Processamento digital dos sinais.....	33
4.5.2 Glicemia.....	34
4.6 Análise estatística.....	35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o segundo país com maior população de animais de estimação do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Neste cenário, destaca-se a população de cães, que é de aproximadamente 29,7 milhões de indivíduos. Muitos destes animais são considerados como parte efetiva da família, conceito que se intensificou na última década no Brasil.

Desta maneira, muitos proprietários passaram a se preocupar mais com a qualidade de vida de seus cães, podendo garantir uma maior longevidade e conseqüentemente uma relação homem-cão mais duradoura. Este fato pode ser evidenciado com o aumento significativo do consumo de ração comercial, uma vez que, na maioria dos casos, fornece uma alimentação mais completa e equilibrada, quando comparada com a alimentação baseada em sobras de mesa.

A alimentação de cães tem um objetivo um pouco diferente da de animais de produção. A alimentação por vezes é utilizada para controle e auxílio de afecções e distúrbios. Contudo, apesar de se registrar progresso no conhecimento a cerca das necessidades nutricionais de cães, são necessárias informações mais precisas sobre quase todos os nutrientes.

Os cães são considerados animais carnívoros por classificação, mas onívoros por hábitos alimentares, tendo uma melhor adaptação a carboidratos do que os gatos, considerados como carnívoros restritos. Porém, este fato não exclui a proteína como um nutriente essencial a dieta de cães, com o intuito de garantir o aporte de aminoácidos essenciais, como é o caso do triptofano.

A principal rota do metabolismo deste aminoácido ocorre no fígado, mas é no sistema nervoso central onde ele será convertido em serotonina. Para que esta conversão ocorra, o triptofano deve atravessar a barreira hematoencefálica, evento que é influenciado principalmente pelo nível de triptofano e de outros aminoácidos da dieta e por fatores inerentes ao próprio animal, como raça, sexo, posição social, idade e nível de atividade.

A serotonina é um neurotransmissor, ou seja, está envolvida na comunicação entre as células do cérebro. Portanto, é fundamental para a percepção e avaliação do meio que rodeia um indivíduo, e para a capacidade de resposta aos estímulos ambientais. Ela produz diferentes efeitos, influenciando diversas áreas do cérebro envolvidas no controle de algumas funções fisiológicas, incluindo liberação de hormônios, função cardiovascular, dor, apetite, humor e comportamento em geral.

Desta maneira, o triptofano é um nutriente potencialmente capaz de modificar as respostas fisiológicas e comportamentais de cães frente a determinados estímulos. Estas alterações podem ser diretamente benéficas ao animal ou indiretamente ao proprietário, afinal, podem gerar uma melhor qualidade de vida a estes animais.

Foram desenvolvidos alguns estudos, em diferentes espécies animais, dentre elas os cães, para avaliar o efeito do triptofano em parâmetros comportamentais e de estresse. Porém, com o aumento do poder da computação nas últimas décadas, técnicas avançadas de processamento digital de sinais surgiram no sentido de permitir a obtenção de informações em sinais elétricos cerebrais, principalmente o eletroencefalograma (EEG).

O EEG constitui-se no registro da atividade elétrica cerebral gerada pelo encéfalo na superfície do escalpo, sendo atualmente a principal fonte de informação não invasiva do registro elétrico cerebral.

Alguns ensaios em ratos e babuínos foram desenvolvidos com o propósito de avaliar o efeito do triptofano na atividade elétrica cerebral. Assim, o desenvolvimento de uma técnica não invasiva de colheita de EEG em cães acordados pode representar uma importante ferramenta na avaliação da atividade cerebral destes animais frente à suplementação de triptofano.

2 OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da suplementação de triptofano na atividade elétrica cerebral (EEG) e taxa glicêmica de cães machos adultos da raça Pit Bull.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a ação de uma dose suplementar de triptofano sobre a atividade elétrica cerebral de cães através de:

- Um método não invasivo de captação de EEG desenvolvido neste trabalho para cães;
- Análise do perfil eletroencefalográfico considerando a energia do sinal das ondas delta (0,3 – 4Hz), teta (4 – 8Hz), alfa (8 – 12Hz) e beta (12 – 30Hz).

Avaliar o efeito da suplementação de triptofano na glicemia de cães através da:

- Análise da variação da glicemia através da confecção de curvas glicêmicas, no tempo, utilizando um glicosímetro portátil.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Há séculos o cão acompanha a espécie humana em seu desenvolvimento, ligado por laços afetivos, como leais companheiros ou até mesmo como fonte de renda, no caso de criadores comerciais. Mesmo sem códigos de comunicação verbal inteligíveis aos humanos, exceto as manifestações de afeto, os cães conquistam lugar na sociedade de consumo em massas e são, em muitos os casos, considerados como membros da família. (SAAD & SAAD, 2005).

Este conceito de considerar os cães como parte efetiva da família tornou-se fato no Brasil na última década. Com a expansão dos grandes centros urbanos os cães suprem a carência de companhia de pessoas que vivem em pequenos espaços (SAAD & SAAD, 2005). Outro fator importante está relacionado com o aumento da expectativa de vida da população humana. Estes idosos, principalmente os de poder aquisitivo mais elevado, buscam nos animais de companhia uma maneira de se ocuparem e se tornarem úteis (SAAD & SAAD, 2005).

Desta maneira, para garantir uma melhor qualidade de vida aos cães e, conseqüentemente, uma relação homem-cão mais duradoura, é importante se ater a questões relacionadas ao correto manejo destes animais.

A alimentação de cães tem um objetivo um pouco diferente da de animais de produção. A alimentação por vezes é utilizada para controle e auxílio de afecções e distúrbios, garantindo uma maior qualidade de vida a estes animais. Contudo, um levantamento dos dados científicos disponíveis

sobre nutrição e, principalmente, sobre alimentos para cães demonstra uma surpreendente escassez de informações (CARCIOFI, 2006).

Apesar do progresso no conhecimento a cerca das necessidades nutricionais de cães e gatos, são necessárias informações mais precisas sobre quase todos os nutrientes (CARCIOFI, 2006).

Os cães, fisiologicamente e metabolicamente, possuem uma melhor adaptação a carboidratos que os carnívoros restritos, por exemplo os gatos. Não possuem rotas de economia de glicose e não possuem rotas tão eficientes de desaminação hepática (SAAD & SAAD, 2005). Possuem alta atividade de amilase pancreática, alta atividade da glicoquinase hepática e muita citrato-liase (SAAD & SAAD, 2005). A glicoquinase media a entrada de glicose no ciclo de Krebs e a terceira permite a estocagem de glicose como lipídeos (SAAD & SAAD, 2005).

Porém, mesmo assim a proteína é um nutriente essencial à dieta de cães. É a partir dela que o animal tem o aporte de aminoácidos essenciais, aporte de nitrogênio para a síntese de aminoácidos indispensáveis e outros produtos que contenham nitrogênio.

Os aminoácidos são importantes constituintes necessários para a síntese de enzimas, e outras proteínas, e utilizados como precursores para a síntese de neurotransmissores e hormônios. Pode-se citar como exemplo a produção da serotonina (5-HT) a partir do triptofano, um aminoácido essencial para cães (YOUNG, 1996).

Quantitativamente, o caminho mais importante no metabolismo do triptofano é a rota da quinurenina, a qual ocorre no fígado, sendo responsável

por mais de 90% do metabolismo do triptofano (SAINIO; PULKKI; YOUNG, 1996).

Outro caminho se encontra no sistema nervoso central (SNC), onde será convertido em serotonina. Em humanos, apenas 1% do triptofano disponível é convertido em serotonina (RODWELL, 1979).

O triptofano destinado ao SNC terá seu primeiro obstáculo na barreira hematoencefálica. A baixa permeabilidade desta ao triptofano exige que utilize a proteína transportadora (Figura 1) de aminoácidos neutros grandes (ANG), porém o triptofano não é o único representante deste grupo e sua vaga no transportador será disputada com os demais, como tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina e valina (OLDENFORD & SZABO, 1976).

Fonte: Kapezinski et al, (???)

Figura 1 – Proteína Transportadora de aminoácidos neutros grandes.

A importância do transportador é fundamental. Através dele é explicado o efeito de dietas contendo altos níveis de proteína na concentração de

triptofano no líquido (Figura 2). O triptofano é encontrado em basicamente todos os ingredientes protéicos, porém em menor concentração quando comparado a outros ANGs (SPRING; CHIODO; BOWEN, 1987). Portanto, altos níveis de proteína aumentam a proporção dos demais ANGs frente à concentração de triptofano, prejudicando a passagem do triptofano pela barreira hematoencefálica.

Outro fator nutricional que pode também elucidar este fato é a concentração e tipo de carboidrato presente na dieta. No sangue o triptofano é encontrado de duas maneiras. Na sua forma livre ou ligada a albumina sérica (Figura 2). Nos mamíferos aproximadamente 80-90% de todas as moléculas de triptofano estão ligadas a albumina sérica (FULLER & ROUSH, 1973).

Dietas ricas em carboidratos induzem a liberação da insulina, a qual facilita a utilização de alguns ANGs pelo músculo esquelético, exceto o triptofano ligado a albumina (POZEFSKY et al, 1969; FERNSTROM & WURTMAN, 1971). Conseqüentemente, a proporção de triptofano frente aos demais ANGs aumenta, resultando em uma vantagem na competição pela utilização do transportador (FERNSTROM & WURTMAN, 1972b).

Sendo assim, o aumento da concentração cerebral de triptofano pode ser conseguido de duas maneiras: ou ocorre o aumento na concentração plasmática de triptofano ou diminui-se a concentração plasmática dos demais ANGs (FERNSTROM & WURTMAN, 1972a; YUWILER et al, 1977).

Acredita-se que, quando carboidratos e proteínas forem ingeridos nas proporções de uma refeição normal, o efeito das proteínas, no sentido de diminuir a oferta de triptofano ao SNC, será predominante (PEREZ-CRUET; CHASE; MURPHY, 1974).

Não apenas fatores nutricionais podem influenciar no transporte através desta barreira e no metabolismo do triptofano. Fatores inerentes aos animais, como raça (BAGSHAW; RALSTON; FISHER, 1994), sexo (HENRY et al, 1996), posição social (RALEIGH et al, 1985; MENCH & SHEA-MOORE, 1995), idade (HENRY et al, 1996; PEREMANS; AUDENAERT; BLANCKAERT, 2002), e nível de atividade (CHAOULOFF et al, 1986), também exercem influência.

Fonte: Adaptado de Bosch et al, (2007)

Figura 2 – Metabolismo do Triptofano no sistema nervoso central.

Uma vez o triptofano vencendo esta barreira, a transformação de triptofano em serotonina ocorre dentro dos corpos dos neurônios serotoninérgicos (GALLAGHER & AGHAJANTAN, 1976).

O primeiro passo para a síntese da serotonina é a hidroxilação do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, gerando o composto 5-

hidroxitriptofano (Figura 2) (CARLSSON & LINDQVIST, 1978). Esta enzima é limitante da síntese de serotonina.

Encontra-se somente 50% saturada nos sítios do SNC onde a serotonina é produzida (YOUNG & GALTHIER, 1981). Portanto, um aumento na concentração de triptofano no SNC pode no máximo dobrar a produção de serotonina (FERNSTROM & WURTMAN, 1972a).

O segundo passo é a descarboxilação deste composto intermediário, tendo como produto final a serotonina (CARLSSON & LINDQVIST, 1978). É uma etapa rápida, portanto este composto intermediário é apenas encontrado em pequenas quantidades. A enzima responsável por esta eficiente transformação, a descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, é amplamente distribuída e age sobre um amplo espectro de substratos (CARLSSON & LINDQVIST, 1978).

Após a produção, a serotonina é armazenada em vesículas pré-sinápticas situadas nos terminais axônicos. Estudos em ratos demonstraram que a atividade de liberação das vesículas obedece a um padrão rítmico lento e que esta liberação depende da atividade neuronal (GALLAGHER & AGHAJANTAN, 1976). Este padrão parece ser uma variação fisiológica, já que essa atividade diminui durante o sono em gatos (PUIZILLOUT et al, 1979).

A serotonina liberada nas fendas sinápticas pode se ligar a vários tipos de receptores (BARNES & SHARP, 1999; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002). Portanto, pode produzir diferentes efeitos nas células pós-sinápticas, influenciando diversas áreas do cérebro envolvidas no controle de algumas funções fisiológicas, incluindo liberação de hormônios, função cardiovascular,

dor, apetite, humor e comportamento em geral (LUCKI, 1998; BARNES & SHARP, 1999).

Podem-se citar alguns estudos desenvolvidos para avaliar o efeito do triptofano em parâmetros comportamentais e de estresse em diferentes espécies animais. Em macacos, estudos mostraram que dietas ricas em triptofano diminuem a agressão (CHAMBERLAIN et al, 1987) e diminuem o comportamento de autoflagelação (WELD et al, 1985). Em raposas o triptofano potencializou o comportamento exploratório (ROUVINEN et al, 1999). Porém, em contraste a estes estudos, a suplementação dietética de triptofano aumentou a agressividade territorial em ratos machos (LASLEY & THURMOND, 1985).

A suplementação de triptofano pode influenciar também a resistência ou tolerância ao estresse (BOSCH et al, 2007). Como uma ferramenta de baixo custo para mensurar este parâmetro pode-se utilizar a confecção de uma curva glicêmica no tempo através do uso de glicosímetro portátil, uma vez que este parâmetro pode ser influenciado devido ao estresse (BEHREND & GRECO, 2000).

Em suínos, um estudo mostrou uma melhor recuperação após estresse social e menor concentração de cortisol plasmático dos indivíduos tratados com dietas ricas em triptofano, quando comparados com animais recebendo dietas com níveis normais (KOOPMANS et al, 2005).

Em humanos, a suplementação de triptofano reduziu os níveis de cortisol plasmático durante um teste aritmético indutor de estresse (MARKUS et al, 2000). Portanto, foi sugerido pelos autores que a suplementação de triptofano pode melhorar a capacidade do indivíduo em lidar com o estresse.

Humanos que apresentam depressão possuem concentração plasmática de triptofano menor do que indivíduos saudáveis (BRANCHEY et al, 1984).

Em ratos, diferentes tipos de estressores, como imobilização, choque no pé e hipotermia aumentaram a reciclagem de triptofano e serotonina (MORGAN; RUDEEN; PFEIL, 1975; DUNN, 1988).

Em cães, pouquíssimos estudos foram desenvolvidos e parecem ser limitados a ensaios não completamente controlados. Em um ensaio utilizando sete cães da raça Golden Retriever, apresentando quadro de agressividade; assim como relatado por seus donos, os ataques de agressividade diminuíram imediatamente após a introdução de uma dieta pobre em proteína, 15 – 18% da energia metabolizável total (MUGFORD, 1987). Infelizmente, nem a composição da dieta experimental, nem a dieta anterior foram reportados. Porém, apenas três cães mantiveram este padrão de comportamento após um período maior de consumo da dieta, dois voltaram a apresentar, em mesma intensidade, o comportamento agressivo e os dois restantes não foram possíveis realizar a colheita dos dados, uma vez que, o contato foi perdido com seus donos (MUGFORD, 1987).

Em outro estudo não completamente controlado, doze cães que apresentavam ou agressividade territorial ou agressividade de dominância e 14 animais controles foram alimentados durante duas semanas por três dietas que variavam na quantidade de proteína presente, 180, 250, 310 g/PB/kg de Matéria Seca (DODMAN et al, 1996). As dietas de baixa e média proteína diminuíram os escores de agressividade territorial, quando comparados com a dieta de alta proteína. Não foi encontrado nenhum efeito significativo com relação à agressividade de dominância e hiperatividade (DODMAN et al, 1996).

Um estudo conduzido por DeNapoli e colaboradores (2000) com 33 cães, alimentados ao acaso durante uma semana, com quatro diferentes tipos de dietas. Com alto ou baixo nível de proteína (aproximadamente 310 ou 190 g/PB/Kg, respectivamente), e com ou sem suplementação de triptofano (1,45 g). Semanalmente foram determinados cinco parâmetros comportamentais e no final de cada período a concentração sérica de triptofano e serotonina. Para cães apresentando agressividade de dominância a adição de triptofano a uma dieta rica em proteína ou a mudança para uma dieta com baixa proteína reduz significativamente este comportamento indesejado. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os demais parâmetros.

Estas pesquisas realizadas visando parâmetros comportamentais e de estresse são extremamente importantes para compreender o efeito do triptofano frente a diferentes quadros de agressão, bem como agentes estressores. Porém, com o aumento do poder da computação nas últimas décadas, técnicas avançadas de processamento digital de sinais surgiram no sentido de permitir a obtenção de informações em sinais elétricos cerebrais, principalmente o eletroencefalograma.

Foi desenvolvido um estudo para elucidar o efeito do L-triptofano, L-3, 4, dihidroxifenilalanina e tranilcipromina no EEG e na epilepsia induzida pela luz em babuínos (MELDRUM et al, 1972). O L-triptofano diminuiu a atividade elétrica de base (AECB) e aumentou a atividade paroxística espontânea no EEG.

Um estudo em ratos avaliou o efeito do L-triptofano e L-5-hidroxitriptofano, precursores da serotonina, na atividade e temperatura

cerebral (IMERI et al, 1999). Sob as condições do estudo, apenas o L-5-hidroxitriptofano alterou a atividade e temperatura cerebral.

Em um ensaio, 18 ratos da linhagem Wistar foram utilizados para mensurar o potencial de uma dieta rica em triptofano em melhorar a recuperação do sono de animais que passaram por quatro dias de restrição calórica e tiveram diminuição da duração do sono (MINET-RINGUETA et al, 2004). Para o monitoramento do sono destes animais foi utilizado o EEG. Os autores concluíram que dietas ricas em triptofano podem constituir uma alternativa eficiente e barata no tratamento de problemas do sono e em suas conseqüências metabólicas.

Em um estudo recente conduzido em ratos, com o intuito de se verificar o efeito de algumas drogas em alguns parâmetros biológicos, dentre eles a atividade elétrica cerebral, o fornecimento suplementar de triptofano alterou a atividade elétrica cerebral, permitindo ao autor sugerir uma diminuição da atividade cerebral frente a esta suplementação (FERRARI, 2008)

O EEG é uma importante ferramenta para monitoramento cerebral nos ensaios de polissonografia. A polissonografia é o método mais objetivo para a avaliação do sono e de suas variáveis fisiológicas. Alguns estudos foram desenvolvidos com propósito de avaliar o efeito do triptofano no sono em humanos (BHATTI, 1998; MORRE et al, 1998; EVANS et al, 2002; AHVENINEN et al, 2003; LANDOLT et al, 2003; PERUGINI et al, 2003; HAYNESA et al, 2004).

3.1 Eletroencefalograma

O EEG constitui-se no registro da atividade elétrica cerebral gerada pelo encéfalo na superfície do escalpo. O sinal elétrico gerado pelo cérebro apresenta uma ampla faixa de frequência, todavia algumas bandas de frequência dominantes são observadas. Elas são chamadas de delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 7 Hz), alfa (8 – 13 Hz) e beta (13 – 30 Hz).

O sinal de EEG é complexo e apresenta propriedades de sinais aleatórios e de sinais determinísticos. Em relação à estacionariedade, propriedade que indica se o conteúdo espectral do sinal não varia com o tempo, o EEG pode ser considerado quase-estacionário apenas em certas condições especiais, como em estado de repouso e com os olhos fechados (COHEN, 1986; SILVA, 1993b). Cabe observar também, que a estacionariedade depende do tamanho do segmento de sinal de EEG analisado. Assim, pode-se assumir que segmentos de EEG relativamente pequenos, com aproximadamente 20 segundos, registrados sob condições comportamentais constantes, são quase-estacionários (COHEN, 1986; SILVA, 1993b).

Para a captação do EEG são utilizados eletrodos, atuando como transdutores que transformam uma corrente iônica (no organismo) em uma corrente elétrica (no sistema medidor) (WEBSTER, 1992; ASTON, 1995; TOAZZA, 1998). Um método utilizado para a realização deste registro é o bipolar, correspondendo ao registro da diferença de potencial entre dois eletrodos que estão sobre regiões onde ocorre atividade elétrica neuronal (MARTIN, 1991).

O contato entre o eletrodo e o escalpo é facilitado pelo uso de um eletrólito especial, geralmente chamado de pasta eletrolítica. A interface eletrodo-eletrólito-escalpo apresenta uma diferença de potencial própria que varia de acordo com os tipos de materiais utilizados (WEBSTER, 1992). Esta diferença de potencial pode variar em função de dois fatores, temperatura e movimentação do eletrodo, mas normalmente o eletrodo é projetado objetivando-se uma variação mínima, para que apresente uma boa estabilidade e não interfira no registro do sinal (WEBSTER, 1992).

O registro do EEG pode ser afetado por ruídos e interferências, também conhecidos como artefatos, que podem ter origem biológica ou não.

A aquisição de sinais de EEG em animais a campo apresenta certas dificuldades técnicas com relação ao ambiente de estudo. Os ruídos gerados por movimentos musculares apresentam frequências dentro da faixa beta, portanto a filtragem simples dificilmente resolve o problema (WEBSTER, 1992). A estratégia é fornecer o máximo de conforto ao animal, evitando com que ele se movimente em demasia.

O movimento dos olhos pode simular ondas lentas com origem frontal (WEBSTER, 1992). Quando se trabalha com animais não é possível controlar este efeito fisiológico.

Com relação às interferências provenientes de fontes não fisiológicas, destaca-se o ruído causado pela rede elétrica (60 Hz), cujos campos gerados podem afetar o registro (METTINGVANRIJN; PEPER; GRIMBERGEN, 1990; WEBSTER, 1992). Porém, esta faixa de frequência está fora das ondas padrões utilizadas e o equipamento possui filtros especiais que evitam estas frequências no sinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados neste experimento, bem como os métodos empregados estão divididos em tópicos para melhor organização do conteúdo.

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido nas instalações pertencentes ao canil da empresa CEPAC (Centro Paulista de Aperfeiçoamento Canino), localizada na Rua Fernando Luiz Landgraf, 5323, Jardim Morumbi, no município de Pirassununga/SP, no período de 10 de abril a 25 de junho de 2008.

As baias do canil (Figura 3) possuem 2 x 3 m, totalizando 6m², com piso revestido de argamassa. As paredes são de blocos de cimento pintadas com camadas de tinta látex na cor marrom. Cada baia possui um bebedouro de barro, um comedouro de alumínio (Figura 4) e um estrado de madeira. Este último evita que o animal perca calor para o piso frio, sendo um importante dispositivo para o conforto térmico.

Os animais foram dispostos em baias iguais, uma ao lado da outra (Figura 5) e voltadas para o mesmo lado, com o intuito de minimizar o efeito ambiental sobre as variáveis estudadas.

Figura 3 – Baia do Canil.

Figura 4 – Comedouro e bebedouro.

Figura 5 – Baias voltadas para a mesma direção

A empresa conta também com uma pista de “*agility*” (Figura 6 e 7) de aproximadamente 150 m² e uma piscina de 10 m de extensão (Figura 8). Estes dois locais foram utilizados diariamente como área de lazer para os cães. Para garantir o bem-estar, e evitar que os animais ficassem estressados, eles foram

soltos dentro da área de “*agility*” por um período de quatro horas e nadaram por dez minutos todos os dias.

Figura 6 – Área de lazer (Vista frontal).

Figura 7 – Área de lazer (Vista lateral).

Figura 8 – Piscina própria para cães.

4.2 Animais

Foram utilizados três cães adultos machos da raça Pit Bull com idade entre 6 e 7 anos e peso médio de $32,6 \pm 5,0$ kg. Previamente ao início do experimento, todos os animais foram submetidos a exames clínicos, hematológicos e coproparasitológico, sendo também desverminados. Foi realizada a mensuração do hematócrito dos animais, uma vez que, problemas com este parâmetro podem invalidar a utilização do glicosímetro como medida de glicose sanguínea em cães (ALEIXO et al., 2006).

Para evitar o estresse do manejo, os animais foram previamente adaptados aos tratadores e as instalações.

4.3 Manejo diário dos animais

A rotina do canil tinha início às 7 horas da manhã com a pesagem das sobras de ração de cada animal. Após esta atividade, era realizada a limpeza dos canis, com a retirada das fezes, desinfecção com produto apropriado e lavagem e secagem dos comedouros e bebedouros. Às 8 horas era efetuada a pesagem e fornecimento de metade da necessidade energética diária para cada animal, além da troca da água.

A mesma tarefa era feita às 17 horas, quando os animais recebiam a outra metade da ração, a água era trocada, a sobra da manhã pesada e o canil era limpo com o mesmo desinfetante. A água foi fornecida *ad libitum*.

Para evitar qualquer tipo de conflito entre os animais, eles foram soltos na área de lazer separadamente. Cada animal permanecia por um período de quatro horas, até que fosse recolhido e outro animal fosse solto. Os dez minutos de natação eram realizados dentro deste período em que o animal tinha a permissão de ficar na área de lazer. Semanalmente os cães tomavam banho com xampu neutro.

4.4 Tratamentos

Os tratamentos foram: A) Dieta base + veículo com placebo (controle); B) Dieta base + veículo com 1,11g de L-triptofano.

No tratamento A foi utilizado como placebo a farinha de trigo. Já que com apenas uma cápsula não era possível atender a suplementação diária de triptofano proposta, foi necessário fornecer, ao mesmo horário, cinco cápsulas diárias. O número de cápsulas fornecidas no tratamento A foi igual ao número de cápsulas fornecidas no tratamento B.

A dose de 1,11 g de L-triptofano utilizada no tratamento B representa uma suplementação de aproximadamente o dobro da necessidade. Como base foi utilizada a recomendação do NRC (2006).

Para garantir que o animal consumisse os tratamentos, sem forçar as cápsulas para dentro da boca do animal, foram utilizadas pequenas rodelas de salsicha com as cápsulas suplementares dentro.

A dieta comercial base era composta de farinha de vísceras de frango, farinha de carne bovina, farinha de arroz, protenose, milho integral moído, espinafre desidratado, cenoura desidratada, levedura seca de cervejaria, farelo de trigo, farelo de soja, gordura de frango, farelo de arroz, cloreto de sódio (sal comum), propionato de cálcio, fosfato bicálcico, premix vitamínico mineral. Na tabela 1 encontram-se os níveis de garantia do produto segundo o rótulo.

Tabela 1 – Níveis de garantia da dieta base segundo o fabricante.

Níveis de garantia	
Umidade (Máx)	12%
Proteína Bruta (Mín)	22%
Extrato Etéreo (Mín)	6%
Matéria Fibrosa (Máx)	4%
Matéria Mineral (Máx)	9%
Cálcio (Máx)	2%
Fósforo (Mín)	0,9%

Máx = Máximo; Mín = Mínimo

Para garantir uma correta ingestão de nutrientes, os níveis de garantia contidos no rótulo do alimento foram checados através da realização de uma

análise bromatológica centesimal, além da mensuração dos níveis de cálcio e fósforo. Os resultados destas análises se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da análise bromatológica.

Análise da Dieta Base	
Umidade	6%
Proteína Bruta*	21,24%
Extrato Etéreo*	11,28%
Matéria Fibrosa*	2,82%
Matéria Mineral*	7,05%
Cálcio*	2,6%
Fósforo*	1,4%

*Valores em matéria original

Pode-se perceber que ocorre certa disparidade entre os dados fornecidos pelo fabricante e a real composição química da dieta. Reforçando a necessidade destas análises para garantir um correto manejo nutricional dos animais. Portanto, a energia metabolizável da ração foi calculada em cima dos valores encontrados na análise bromatológica utilizando-se as fórmulas do NRC (2006). Conforme segue:

- *Passo 1: Cálculo do Extrativo Não-Nitrogenado (ENN):*

$$\text{ENN} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ PB} + \% \text{ FB} + \% \text{ EE} + \% \text{ MM})$$

$$\text{ENN} = 100 - (6 + 21,24 + 2,82 + 11,28 + 7,05)$$

$$\text{ENN} = 51,61\%$$

- *Passo 2: Cálculo da energia bruta (EB):*

$$\text{EB (kcal/Kg)} = (5,7 \times \text{g PB}) + (9,4 \times \text{g EE}) + [4,1 \times (\text{g ENN} + \text{g FB})]$$

$$\text{EB (kcal/kg)} = (5,7 \times 212,4) + (9,4 \times 112,8) + [4,1 \times (516,1 + 28,2)]$$

EB (kcal/kg) = 4502,63 kcal/kg de ração

- *Passo 3: Determinação do coeficiente de digestibilidade da energia (CDE):*

$$CDE = 91,2 - (1,43 \times \text{porcentagem de FB, na matéria seca})$$

$$CDE = 91,2 - (1,43 \times 3,0)$$

CDE = 86,91%

- *Passo 4: Determinação da energia digestível (ED):*

$$ED = (\text{kcal/Kg}) = EB \times CDE/100$$

$$ED = (\text{kcal/Kg}) = 4502,63 \times 0,8691$$

ED = (kcal/Kg) = 3913,2 kcal/kg de ração

- *Passo 5: Determinação da energia metabolizável (EM):*

$$EM (\text{kcal/Kg}) = ED - (1,04 \times \text{g PB})$$

$$EM (\text{kcal/Kg}) = 3913,2 - (1,04 \times 212,4)$$

EM (kcal/Kg) = 3692,3 kcal/kg de ração

Conforme anteriormente citado, os níveis dos demais aminoácidos grandes neutros interferem na passagem do triptofano pela barreira hematoencefálica. Portanto, foi realizado o perfil aminoacídico da dieta, através da cromatografia líquida. O resultado se encontra na tabela 3.

Tabela 3 – Perfil aminoacídico da dieta base.

Aminoácido	Unidade	Resultado
Alanina	%	2,01
Arginina	%	2,01

**continuação*

Aminoácido	Unidade	Resultado
Isoleucina	%	1,15
Leucina	%	2,5
Ácido Glutâmico	%	5,68
Lisina	%	1,61
Cistina	%	0,12
Metionina	%	0,87
Fenilalanina	%	1,14
Tirosina	%	0,8
Treonina	%	1,01
Triptofano	%	0,17
Prolina	%	2,33
Valina	%	1,3
Histidina	%	0,53
Serina	%	1,23

A ração foi fornecida de maneira controlada e dividida em duas porções diárias. Para o cálculo diário de fornecimento de ração foi utilizada a fórmula para requerimento de Energia Metabolizável preconizada pelo NRC (2006) para cães “terriers” de canil.

$$\text{Requerimento de EM (kcal/dia)} = 140 \times \text{PV}^{0,75}$$

Sendo assim, considerando o peso médio dos animais, a ingestão média de ração foi de $517 \text{ g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Logo, o consumo de triptofano advindo da dieta foi de $0,877 \text{ g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Somando-se com a suplementação diária, o consumo diário de triptofano por animal por dia no tratamento B foi de aproximadamente 1,98 g. Portanto, representando um consumo total de triptofano de aproximadamente 316 % da necessidade diária segundo NRC (2006).

4.5 Procedimento experimental

Os animais passaram por um período de adaptação de 10 dias. Durante este período, o sistema de manejo foi padronizado, sendo as refeições, pesagem das sobras, a limpeza das baias e a limpeza do setor realizada nos mesmos horários e pelos mesmos funcionários, visando condicionar os animais aos procedimentos. Este período foi destinado também para proporcionar tempo suficiente para que os animais regularizassem seus ritmos de ingestão, excreção e eliminassem qualquer fator de estresse. Os animais foram pesados no início e no final do experimento.

Inicialmente os animais foram submetidos a um pré-experimento, com duração e metodologia idênticas ao presente ensaio, para que se adaptassem as técnicas e com a finalidade de treinamento do pessoal envolvido com a colheita dos dados, uma vez que, os responsáveis pela realização das colheitas não tinham experiência suficiente com a utilização dos aparelhos empregados na técnica de eletroencefalografia. Após o término do pré-experimento os animais passaram por sete dias de descanso, seguindo as mesmas normas de manejo diário, e se deu início a presente experimentação.

Os animais passaram por doze dias de fornecimento de suplementação com o placebo, destes, cinco dias foram destinados a colheita dos dados. Os dias de colheita foram 0, 3, 6, 9 e 12. Depois os animais passaram por três dias de descanso, e teve início o período de suplementação com triptofano. Neste, ocorreu o aumento de um dia de colheita. Portanto foram colhidos nos dias 0, 1, 3, 6, 9, 12.

Esta disposição temporal dos dias de colheita foi determinada com o intuito de que, caso o triptofano apresentasse o efeito esperado, fosse possível determinar em uma escala de tempo o momento que o efeito ocorreu.

O fornecimento da suplementação foi realizado em horários diferentes para cada animal. Os horários de fornecimento foram 09:00, 09:50, 10:40; respectivamente para cada animal. Esta variação temporal ocorreu pelo fato de se levar aproximadamente 50 minutos para registrar todas as variáveis propostas. Sendo assim, o período entre a suplementação e a mensuração das variáveis foi igual para todos os animais. É importante salientar que tanto a ordem de suplementação como a de colheita dos dados nos indivíduos foi mantida durante todo o período experimental.

Durante os dias de colheita dos dados foram realizadas mensurações do EEG e glicemia dos animais.

Durante todo o período do experimento foi realizada, a cada hora, a medição da temperatura do ar e umidade relativa, uma vez que, estas variáveis influenciam no conforto térmico do animal e conseqüentemente em seu nível de estresse. Para isso, foi instalado em cada baia dos animais um globo negro dotado de um termômetro dentro e um “Data Logger”, capaz de mensurar a umidade relativa do ar e armazenar os dados (Figura 9).

Figura 9 – Globo Negro e “Data Logger” para mensuração de temperatura e umidade.

4.5.1 Aquisição de sinal cerebral

4.5.1.1 Equipamento

O EEG foi registrado utilizando-se o sistema de aquisição de sinais elétrico cerebral desenvolvido por Silva (2005) e Arce (2008) para bovinos, o qual foi adaptado neste trabalho para cães.

O equipamento de aquisição de dados segue as normas padrões de segurança e qualidade para equipamentos médicos, portanto utilizam componentes eletrônicos, especificamente desenvolvidos para esta área da instrumentação. O sistema constitui-se de dois módulos: o módulo um, de amplificação e transmissão do sinal de EEG e o módulo dois de recepção e conexão do sistema com o computador.

O módulo um (Figura 10 e 11) medindo 2,5 x 7,0 x 11 cm e pesando 180g é o módulo que fica próximo ao animal e possui três funções básicas:

1. Amplificação e condicionamento do sinal;
2. Conversão digital e sistema de controle de comunicação digital micro-processada;
3. Transmissão dos dados digitais.

O módulo dois (Figura 12) de mesmo peso e medida é responsável pela recepção do sinal enviado pelo módulo um, ou seja, é uma estação rádio-base.

A interface entre o módulo dois e a estação rádio-base é feita através de um software que realiza as seguintes tarefas:

- Comunica-se com o módulo dois usando uma API (do inglês, “Aplication Program Interface”) do sistema operacional Windows®,
- Gera uma saída gráfica dos sinais de EEG do animal na tela e armazena a informação em um banco de dados.

A figura 13 mostra a tela principal do software de aquisição de sinais de EEG.

Figura 10 – Módulo 1.

Figura 11 – Módulo 1 (componentes).

Figura 12 – Módulo 2.

Figura 13 – Tela principal do software.

4.5.1.2 Metodologia

Para a colheita do EEG foram utilizados três eletrodos de superfície (Figura 14); dois posicionados na cabeça (registro bipolar) e um (terra)

posicionado no “calo” do cotovelo do animal (Figura 15). Este tipo de eletrodo permitiu em outras espécies a medição da atividade elétrica cerebral de uma maneira não-invasiva, podendo ser uma potencial ferramenta a ser utilizada em cães.

Todos os experimentos para a colheita do EEG foram realizados com os animais acordados. Tentou-se limitar ao máximo a movimentação do animal, mas sem stressá-lo ou deixá-lo em uma posição desconfortável, já que, estes eventos poderiam influenciar na colheita dos dados. Na região de colheita foi realizada uma tricotomia e aplicação de gel condutor específico para EEG.

Figura 14 – Eletrodos de superfície.

Figura 15 – Eletrodos posicionados no animal.

Para testar o novo sistema de captação do EEG desenvolvido neste trabalho, os eletrodos foram fixados em diferentes posições na superfície da pele na cabeça do animal, após tricotomia, com especial atenção para manter o eletrodo preenchido com gel de contato. Podendo assim eleger a melhor localização dos eletrodos para que fosse realizada corretamente a colheita dos dados (FIGURA 16).

Figura 16 – Posicionamento dos eletrodos na cabeça do animal.

O sinal foi colhido numa frequência de amostragem de 120 Hz por um período de 20 minutos por dia de colheita e as medições seguiram o esquema de suplementação, o primeiro animal a receber a suplementação foi o primeiro a passar pelo procedimento, aproximadamente cinco horas após a suplementação.

4.5.1.3 Processamento digital dos sinais

O sinal digital obtido foi processado usando a transformada rápida de Fourier (FFT) implementada no MATLAB[®]. Foram analisados vários trechos sucessivos de três segundos livres de artefatos que foram filtrados em quatro bandas de frequências: delta (0,3 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 12 Hz) e beta (12 – 30 Hz). Foram usados filtros elípticos de ordem quatro, integrados em uma ferramenta visual desenvolvida no MATLAB[®]. Neste sistema de processamento digital do sinal, foi calculada em cada um dos trechos

selecionados a energia do sinal digital em cada uma das bandas de freqüência. A energia do sinal digital pode ser definida como a somatória do quadrado do módulo das amplitudes em um intervalo finito (PROAKIS & MANOLAKIS, 2002).

4.5.2 Glicemia

Para a mensuração da glicose sanguínea foi utilizado um glicosímetro modelo Accu-Chek Advantage II do laboratório Roche Diagnóstica Brasil Ltda. Foram seguidas todas as instruções fornecidas pelo fabricante.

Previamente, na região destinada à colheita foi realizada uma assepsia com álcool a 70%. O sangue foi obtido mediante uma punção realizada em uma das orelhas do animal por uma agulha hipodérmica descartável (Figura 17), com calibre 25 x 0,7 mm, realizando a colheita de uma ou duas gotas de sangue (Figura 18). Imediatamente após a colheita o sangue foi depositado na fita de leitura do glicosímetro, introduzida no aparelho, e o resultado foi fornecido em aproximadamente 25 segundos (Figura 19)

Figura 17 – Punção na orelha.

Figura 18 – Colheita do sangue.

Figura 19 – Espera do Resultado

As colheitas foram realizadas nos períodos 0, 15, 30, 45 minutos. Sendo estes relacionados com o período destinado ao manejo de colheita de cada animal. A partir destes dados, foram confeccionadas curvas glicêmicas de cada animal, com o intuito de evidenciar o comportamento da glicemia durante determinado período.

4.6 Análise estatística

O programa SAS (Statistical Analysis System, 1998) foi utilizado para os procedimentos estatísticos. Os dados foram primeiramente avaliados quanto à normalidade dos resíduos, homogeneidade de variância e presença de outliers. Nenhuma transformação dos dados foi necessária.

O estudo das ondas cerebrais foi feito separadamente em cada cão, dentro de cada tratamento alimentar (placebo ou triptofano). Foi realizada uma análise de regressão linear para avaliar o efeito de dias de colheitas de EEG (Proc Reg) e os componentes quadrático e cúbico também foram testados.

Os dados de glicemia foram avaliados como medidas repetidas no tempo por análise de máxima verossimelhança restrita (REML) para um

delineamento inteiramente ao acaso utilizando o procedimento Mixed do SAS. Foi ajustado um modelo misto linear contendo os efeitos fixos de tratamento alimentar, dia de colheita, minuto de colheita e as respectivas interações. Quando necessário, contrastes ortogonais foram utilizados para avaliar comportamentos linear, quadrático e cúbico de efeitos estruturados em níveis (dias e minuto de colheita).

Os efeitos fixos presentes nos modelos foram considerados significantes a uma probabilidade menor que 5% e como tendências quando os valores de P estiveram entre 5% e 10%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 4 encontram-se os resultados climáticos médios colhidos durante o experimento.

Tabela 4 – Valores médios de temperatura do ar e umidade relativa por baia por período.

	Placebo		Triptofano	
	Temperatura	Umidade	Temperatura	Umidade
Baia (Animal 1)	20,7 ⁰ C ± 3,8a	64,7% ± 15,4a	21,3 ⁰ C ± 3,2a	62,6% ± 13,4a
Baia (Animal 2)	21,2 ⁰ C ± 3,2a	64,4% ± 15,3a	21,1 ⁰ C ± 2,9a	62,5% ± 14,1a
Baia (Animal 3)	20, 4 ⁰ C ± 3,9a	64,4% ± 14,9a	20,8 ⁰ C ± 2,6a	62,4% ± 14,2a
Média do Período	20,76⁰C	64,5%	21,06⁰C	62,5%

Cada período (placebo e triptofano) corresponde a 12 dias de colheitas horárias de dados por baia, sendo representados no final por uma média geral. Os resultados indicam que não houve diferença significativa nos valores encontrados entre os períodos. Portanto, esta variável não pode ser considerada como uma possível interferência nos resultados deste experimento.

Na figura 20 é apresentado um exemplo de espectro de freqüência do sinal captado em uma das colheitas de EEG. Verifica-se a presença das freqüências típicas de sinal cerebral (1 a 30 Hz), o que também ocorreu em todos os trechos de EEG analisados, demonstrando que o sistema não invasivo de captação do sinal elétrico cerebral desenvolvido neste trabalho foi sensível para captar as freqüências que caracterizam o EEG.

Figura 20 – Espectro de frequência do sinal captado.

Nas figuras 21 e 22, são apresentados dois exemplos de registros brutos de EEG, obtidos no experimento. Nestes, é observada apenas a variação temporal da amplitude do EEG de animais nos diferentes tratamentos, sem que seja possível uma avaliação quantitativa do sinal, já que, para isso, é necessário o uso de técnicas de processamento. Portanto, em um primeiro momento, não é possível afirmar que diferenças qualitativas no sinal sejam devido a alguma ação do tratamento, assim como também não é possível avaliar o padrão de variação do EEG nas diferentes frequências presentes no sinal.

Figura 21 – Registro de EEG adquirido de um cão recebendo veículo mais placebo na amostragem de 120 Hz. Eixo x = tempo (s); eixo y = μV^2

Figura 22 – Registro de EEG adquirido de um cão recebendo veículo mais triptofano na amostragem de 120 Hz.

Assim, em cada trecho contínuo de cinco minutos de EEG foram selecionados intervalos de três segundos livres de artefato, para obter a

energia das freqüências de ondas delta (0,3 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 12 Hz) e beta (12 – 30 Hz) separadamente, usando um programa de computador escrito na ferramenta computacional Matlab®, como mostra as figuras 23 e 24.

Figura 23 – Gráfico do sinal de EEG de 3s de um cão recebendo veículo mais placebo.

Figura 24 – Gráfico do sinal de EEG de 3s de um cão recebendo veículo mais triptofano.

Decompondo o sinal de EEG nas diferentes faixas, foi possível avaliar o valor da energia do sinal, que é proporcional a sua amplitude em uma dada faixa. Desta forma, a metodologia permite a captação de diferenças quantitativas no sinal cerebral, que podem ser resultantes de fatores ambientais como, por exemplo, diferentes tratamentos alimentares impostos dentro de um estudo. Isto foi confirmado pelos resultados apresentados a seguir, relativos à comparação da energia do sinal cerebral obtido em animais alimentados, ou não, com triptofano suplementar (Figuras 25 a 36).

Nas figuras 25 a 27 são apresentados os padrões das ondas delta em função do tempo e do tratamento alimentar, nos três cães avaliados.

Figura 25 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 26 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 27 – Variação da energia do sinal da onda delta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Pode-se observar que nos três cães, a energia do sinal cerebral variou com o tempo de avaliação apenas quando aqueles receberam triptofano suplementar, sendo que, quando foi administrado o placebo, a energia se manteve constante em valores próximos a $0,24 \mu V^2$. Quando administrado aquele aminoácido, a amplitude das ondas variou quadraticamente em relação ao tempo de colheita de EEG em todos os indivíduos. Desta forma, pode-se afirmar que a adição de triptofano suplementar na dieta de cães pode alterar a variação da energia do sinal na faixa delta das ondas cerebrais.

O mesmo pode ser afirmado quanto às ondas teta, cujos resultados são apresentados nas figuras 28 a 30.

Figura 28 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 29 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 2 sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 30 – Variação da energia do sinal da onda teta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Diferentemente da onda delta, a amplitude dos sinais cerebrais no tratamento placebo variou de forma quadrática em função dos dias de avaliação, em dois dos três cães avaliados. No animal 1, a amplitude se manteve constante em torno de $0,11 \mu V^2$.

Assim como ocorrido em dois animais recebendo placebo, a energia do sinal variou de forma quadrática nos três indivíduos alimentados com triptofano. Entretanto, pode-se observar que, neste caso, os coeficientes angulares das regressões são maiores que aqueles observados para o tratamento placebo, indicando inclinações das curvas mais acentuadas e diferenças no padrão de variação das ondas teta entre animais recebendo placebo e triptofano. Além disso, no tratamento em que o aminoácido foi fornecido na dieta, os coeficientes de determinação são maiores que no tratamento placebo, indicando que o modelo quadrático utilizado se ajusta melhor aos dados,

sugerindo novamente que o triptofano apresenta efeitos sobre a energia das ondas teta.

Figura 31 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 32 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 33 – Variação da energia do sinal da onda alfa do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

O triptofano também alterou a energia do sinal das ondas alfa (Figuras 31 a 33) e beta (Figuras 34 a 36).

Para as ondas alfa, o animal 1 apresentou um efeito quadrático negativo, quando suplementado com placebo, e quadrático positivo quando suplementado com triptofano. Nos animais 2 e 3 o comportamento alterou de linear negativo para quadrático positivo e cúbico, respectivamente. Os coeficientes de determinação encontrados nos modelos do tratamento placebo explicam muito pouco a variação encontrada, reforçando a afirmativa de que houve efeito do triptofano sobre as ondas cerebrais alfa.

Figura 34 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 1, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 35 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 2, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Figura 36 – Variação da energia do sinal da onda beta do animal 3, sem e com suplementação de triptofano, em função do tempo de avaliação.

Já para as ondas beta, o modelo que explica a variação no animal 1 passou de cúbico para quadrático positivo. O animal 2 apresentou energia do sinal constante ($0,12 \mu V^2$) durante os 12 dias de avaliação em que foi fornecido apenas um placebo, enquanto que, quando suplementado com triptofano, a energia das ondas variou de forma cúbica em função dos dias. Já para o animal 3, a energia do sinal cerebral foi influenciada cubicamente pelos dias de avaliação em ambos tratamentos, contudo, o triptofano modificou significativamente o grau de inclinação da curva e o coeficiente de determinação do modelo.

Com relação à glicose sanguínea, os resultados encontram-se dispostos nas figuras 37 a 39.

Figura 37 – Variação média da curva glicêmica, em mg/dl, durante o tempo, em minutos.

Figura 38 – Valor médio da glicemia, em mg/dl, durante os dias de mensuração.

Não houve interação entre os fatores tratamento alimentar (administração de triptofano) e tempo de colheita (dias e minutos dentro de

cada dia de mensuração) ($P>0,05$). Foi observado que o nível de glicose sanguínea variou quadraticamente em função do tempo de colheita (minutos) dentro de cada dia de mensuração (Figura 37, $P<0,01$) e que houve uma tendência ($P=0,07$) de um aumento linear na glicemia em entre os dias de colheita (Figura 38). Entretanto, não houve efeito significativo do fornecimento de triptofano suplementar sobre a glicemia dos cães utilizados neste experimento (Figura 39, $P>0,05$).

Figura 39 – Média geral para a glicemia nos diferentes tratamentos alimentares, em mg/dl.

Existem várias técnicas para avaliar alterações na atividade cerebral como a tomografia por emissão de pósitrons, ressonância magnética funcional, medidas da atividade magnética cerebral e medidas da atividade elétrica cerebral (Eletroencefalografia – EEG). A vantagem do monitoramento da atividade elétrica cerebral através do EEG está principalmente no baixo custo dos procedimentos, sua excelente resolução temporal e na possibilidade de se utilizar ferramentas matemáticas para se retirar um maior número de

informações do sinal obtido. Nesse sentido, um método não invasivo e bastante simples de captação de EEG para cães foi desenvolvido neste trabalho e permitiu captar a atividade elétrica cerebral de animais acordados em função do tempo.

O sinal elétrico cerebral possui amplitudes reduzidas e os dados obtidos podem ser prejudicados pela movimentação do animal. Por este motivo, a escolha do ponto para o posicionamento dos eletrodos é de grande importância para a qualidade do sinal adquirido. Assim, a sensibilidade do equipamento de colheita do sinal elétrico encefálico é fundamental para permitir o uso de eletrodos acoplados na superfície da cabeça do animal, como acontece em humanos.

Para o EEG em cães não há um sistema padronizado de posicionamento dos eletrodos. No presente trabalho pode-se verificar que o EEG obtido de eletrodos fixados na posição escolhida na cabeça destes animais permitiu retirar vários trechos de três segundos livres de artefatos. Além do mais, através da análise do espectro de potência dos sinais obtidos, foi elucidada a presença de frequências típicas de sinal cerebral, reforçando a afirmação de que tanto a metodologia empregada, bem como os equipamentos são capazes de captar sinais cerebrais de animais acordados. Portanto, gerando uma base de dados confiável, podendo esta ser processada com o intuito de se obter o maior número de informações possíveis destes dados.

A suplementação de triptofano diminuiu a energia das bandas de frequências beta, teta, alfa e delta. Esses resultados permitem sugerir que o triptofano promoveu alterações no sentido de modificar a atividade elétrica cerebral. Nenhum estudo havia sido anteriormente conduzido em cães para

elucidar o efeito da suplementação de triptofano na atividade elétrica cerebral. Os ensaios realizados em humanos (BHATTI, 1998; MORRE et al, 1998; EVANS et al, 2002; AHVENINEN et al, 2003; LANDOLT et al, 2003; PERUGINI et al, 2003; HAYNESA et al, 2004) e em ratos (MINET-RINGUETA et al, 2004) foram voltados para verificar o efeito do triptofano em estudos do sono somente, utilizando o EEG apenas como um parâmetro de monitoramento e não como uma ferramenta para processamento e extração de dados.

Apenas um trabalho da literatura conduzido em ratos (FERRARI, 2008) utilizou metodologia e proposta parecida com aquela empregada neste estudo. Na citada investigação, a suplementação de triptofano diminuiu a energia do sinal das bandas de frequência beta e teta, aumentou a energia da banda delta e não foi capaz de alterar a banda de frequência alfa, tendo sido sugerido que a suplementação de triptofano promoveu alterações no sentido de reduzir a atividade elétrica cerebral de ratos. Sendo assim, pode-se afirmar que os resultados apresentados no estudo de Ferrari (2008) corroboram aqueles encontrados pela presente investigação em relação à administração de triptofano suplementar em dietas para cães ser capaz de alterar a atividade elétrica cerebral.

Não é possível afirmar que a suplementação de triptofano alterou o comportamento dos cães utilizados neste ensaio, uma vez que não foi realizado um estudo embasado em protocolos comportamentais. Portanto, não se pode afirmar também que a modificação observada na atividade cerebral está relacionada a uma diminuição na frequência com que ocorrem determinados comportamentos indesejáveis em cães, como agressividade territorial, agressividade de dominância e hiperatividade.

Estudos anteriores comprovaram a relação positiva entre níveis de ingestão de triptofano e sua concentração plasmática (FERNSTROM & WURTMAN, 1972b), e conseqüentemente influenciando na concentração cerebral de triptofano (FERNSTROM & WURTMAN, 1972a; YUWILER et al, 1977). Por sua vez, um aumento na concentração cerebral de triptofano acarreta em um aumento na produção de serotonina, podendo no máximo dobrar a sua produção (FERNSTROM & WURTMAN, 1972a). A serotonina é um neurotransmissor que pode se ligar a vários tipos de receptores (BARNES & SHARP, 1999; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002). Portanto, pode produzir diferentes efeitos nas células pós-sinápticas, influenciando diversas áreas do cérebro envolvidas no controle de algumas funções fisiológicas, incluindo humor e comportamento no geral (LUCKI, 1998; BARNES & SHARP, 1999). Os resultados de EEG não permitem afirmar também que o triptofano promoveu alterações na síntese de serotonina, mas permite afirmar que a atividade elétrica cerebral alterou após a sua administração. Tanto os mecanismos comportamentais como os envolvidos em um provável aumento na produção de serotonina merecem ser investigados futuramente.

Com relação à curva glicêmica dos animais, a realização da colheita da glicemia utilizando-se um glicosímetro portátil já havia sido validada para cães (ALEIXO et al., 2006). Determinados estudos nutricionais relacionados com índices glicêmicos de fontes de carboidratos (SILVA JÚNIOR et al, 2005) reforçam a utilização desta metodologia empregada como sendo válida para cães.

Autores sugerem que a realização de uma curva glicêmica no tempo pode ser utilizada como uma medida de estresse, uma vez que, este evento

está associado a uma “descarga adrenérgica” (BEHREND; GRECO, 2000). Outros autores afirmam que o controle glicêmico pode ser prejudicado em alguns estágios fisiológicos e condições de saúde, sendo um deles o estresse (NELSON et al., 1990; KAHN et al., 2001). Desta maneira, através dos resultados obtidos sugere-se que a dose suplementar de triptofano utilizada neste experimento não foi capaz de reduzir o nível de estresse de cães, uma vez que os níveis sanguíneos de glicose não foram modificados pela adição de triptofano suplementar na dieta.

Deve-se ressaltar que o nível de estresse que os animais foram submetidos pode não ter sido elevado. Considerou-se que aquela situação era estressante pelo fato dos animais terem sido mantidos sem movimentação extrema durante a colheita de EEG, ocorrida em horários quentes do dia (entre 14 e 17 horas). Outro ponto importante é o fato de que os animais passaram por um pré-experimento, o qual foi conduzido sob o mesmo protocolo do ensaio em questão, com o intuito de treinar as pessoas envolvidas na colheita de dados. Isso pode ter feito com que os animais se adaptassem aos procedimentos impostos, tornando-se, portanto, em uma escala temporal, menos estressante. Desta forma, pode-se sugerir que o fornecimento de triptofano dietético suplementar para cães deve ser avaliado em indivíduos sob condições de estresse mais intenso, como por exemplo, em animais submetidos a transporte por tempos prolongados.

6 CONCLUSÃO

O sistema não invasivo de captação de EEG desenvolvido para cães é capaz de gerar dados confiáveis desta medida, permitindo adquirir e analisar o sinal elétrico cerebral de cães acordados.

A suplementação de cães com triptofano na dose de 1,11g (aproximadamente o dobro da necessidade diária) altera a variação da energia do sinal das ondas delta, teta, alfa e beta. Portanto, modifica a atividade elétrica cerebral de cães. Esta alteração ocorre de maneira diferente para cada faixa de frequência específica. O comportamento da curva glicêmica não sofreu efeito do tratamento imposto.

Estudos futuros com cães se fazem necessários para poder entender o efeito que as variações na energia do sinal das ondas delta, teta, alfa e beta possuem em relação a comportamentos indesejados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENINEN, J.; JÄÄSKELÄINEN, L. P.; PENNANENG, S. LIESIVUORIH, J.; ILMONIEMIB, R. J.; KÄHKÖNENA, S. Auditory selective attention modulated by tryptophan depletion in humans. **Neuroscience Letters**, v. 340(3), p.181-184, 2003.

ALEIXO, G. A. S.; COELHO, M. C. O. C.; GUIMARÃES, A. L. N.; ANDRADE, M. B. et al. Fatores que podem invalidar os resultados da mensuração dos níveis glicêmicos em cães utilizando o glicosímetro portátil. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n. 4, p.447-454, out./dez. 2006.

ARCE, A. I. C. Redes de sensores sem fio na colheita de dados fisiológicos de bovinos para aplicações na zootecnia de precisão. 2008. 107f. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

ASTON, R. Principles of biomedical instrumentation and measurement. New York: **Macmillan Publishing Company**, 1995.

BAGSHAW, C. S.; RALSTON, S. L. & FISHER, H. Behavioral and physiological effect of orally administered tryptophan on horses subjected to acute isolation stress. **Appl. Anim. Behav. Sci.** v.40, p.1–12, 1994.

BARNES, N. M. & SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology** v.38, p.1083–1152, 1999.

BEHREND, E. N.; GRECO, D. S. Feline diabetes mellitus: evaluation of treatment. **Compendium on Continuing Education of the practicing Veterinarian**, Trenton, v. 22, n. 5, p. 440-451, 2000.

BHATTI, T. Effects of a Tryptophan-Free Amino Acid Drink Challenge on Normal Human Sleep Electroencephalogram and Mood . **Biological Psychiatry** , v.43 , Issue 1 , p.52 – 59, 1998.

BOSCH, G.; BEERDA, B.; HENDRIKS, W. H.; VAN DER POEL, A. F. B.; VERSTEGEN, M. W. A. Impact of nutrition on canine behavior: current status an possible mechanisms. **Nutrition Research Reviews**, 15p., 2007.

BRANCHEY, L.; BRANCHEY, M.; SHAW, S.; LIEBER, C. S. Depression, suicide, and aggression in alcoholics and their relationship to plasma amino acids. **Psychiatry Res**, v.12, p.219–226, 1984.

CARCIOFI, A.C. Ingredientes energéticos e protéicos para cães e gatos. In: **Anais do II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal**, 2006, São Paulo, CD-ROM.

CARLSSON, A. & LINDQVIST, M. Dependence of 5-HT and catecholamine synthesis on concentrations of precursor amino-acids in rat brain. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.303, p.157–164, 1978.

CHAMBERLAIN, B.; ERVIN, F. R.; PIHL, R. O.; YOUNG, S. N. The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. **Pharmacol Biochem Behav** v.28, p.503–510, 1987.

CHAOULOFF, F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. **Brain Res Rev**, v.18, p.1–32, 1993.

CHAOULOFF, F.; LAUDE, D.; GUEZENNEC, Y. & ELGHOZI, J. L. Motor activity increases tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid in ventricular cerebrospinal fluid of the conscious rat. **J Neurochem**, v.46, p.1313–1316, 1986.

COHEN, A. Biomedical signal Processing – Volume I: Time and frequency. Domains Analysis. **CRC Press**, 1986.

DeNAPOLI, J. S.; DODMAN, N. H.; SHUSTER, L.; RAND, W. M.; GROSS, K. L. Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.217, p.504–508, 2000.

DODMAN, N. H.; REISNER, I. R.; SHUSTER, L.; RAND, W. M.; LUESCHER, U. A.; ROBINSON, I.; HOUP, K. A. Effect of dietary protein content on behavior in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.208, p.376–379, 1996.

DUNN, A. J. Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. **Life Sci**, v.42, p.1847–1853, 1988.

EVANS, L.; GOLSHAN, S.; KELSOE, J.; RAPAPORT, M.; RESOVSKY, K.; SUTTON, L.; GILLIN, J. C. Effects of rapid tryptophan depletion on sleep electroencephalogram and mood in subjects with partially remitted depression on bupropion. **Neuropsychopharmacology**, v.27(6): p.1016-26, 2002.

FERNSTROM, J. D. & WURTMAN, R. J. Elevation of plasma tryptophan by insulin in rat. **Metabolism**, v.21, p.337–342, 1972b.

FERNSTROM, J.D, & WURTMAN, R. J. Brain serotonin content: increase following ingestion of a carbohydrate diet. **Science**, v.174, p.1023-1025, 1971.

FERNSTROM, J.D. & WURTMAN, R. J. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. **Science**, v.178, p.149–152, 1972a.

FERRARI, R. Efeitos da administração de ácido indol-3-acético (AIA) sobre parâmetros metabólicos e eletroencefalográficos em ratos. 2008. 108f. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

FULLER, R. W. & ROUSH, B. W. Binding of tryptophan to plasma proteins in several species. **Comp Biochem Physiol**, B 46, p.273–276, 1973.

GALLAGHER, D.W. & AGHAJANTAN, G.K. Inhibition of firing of raphe nucleus by tryptophan and 5-hydroxytryptophan blockade by inhibiting serotonin synthesis with Ro-4-4602. **Neuropharmacol** v.15, p.149-156, 1976.

HAYNESA, P. L.; MCQUAIDB, J. R.; KELSOEB, J.; RAPAPORTB, M.; GILLINB, J. C. Affective state and EEG sleep profile in response to rapid tryptophan depletion in recently recovered nonmedicated depressed individuals.

Journal of Affective Disorders, v. 83(2-3), p.253-262, 2004.

HENRY, Y.; SEVE, B.; MOUNIER, A. & GANIER, P. Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. **J**

Anim Sci, v.74, p.2700–2710, 1996.

HOYER D.; HANNON, J. P. & MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v.71, p.533–554, 2002.

IMERI, L.; MANCIA, M.; BIANCHI, S.; OPP, M. R. 5-hydroxytryptophan, but not Image L-tryptophan, alters sleep and brain temperature in rats. **Neuroscience**, v.95(2), p.445-452, 1999.

KAHN, S.E. et al. Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet b-cell function as explanations for metabolic diversity. **Journal of Nutrition.**, v. 131, p. 354S-360S, 2001.

KAPEZINSKI, F.; BUSNELLO, J.; ABREU, M. R.; CARRÃO, A. D. Aspectos da fisiologia do triptofano. Revisão da Literatura.**Rev Psiquiatria clínica.** ?????

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, v.85, p.469–478 (2005).

LANDOLT , H.; KELSOE , J. R.; RAPAPORT, M. H.; GILLIN, J. C. Rapid tryptophan depletion reverses phenelzine-induced suppression of REM sleep. **Journal of Sleep Research**, v. 12(1), p.13-18, 2003.

LASLEY, S. M. & THURMOND, J. B. Interaction of dietary tryptophan and social isolation on territorial aggression, motor activity, and neurochemistry in mice. **Psychopharmacology** v.87, p.313–321, 1985.

LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biol. Psychiatry**, v.44, p.151–162, 1998.

MARKUS, C. R.; OLIVIER, B.; PANHUYSEN, G. E.; VAN DER GUGTEN, J.; ALLES, M. S.; TUITEN, A.; WESTENBERG, H. G.; FEKKES, D.; KOPPESCHAAR, H. F.; DE HAAN, E. E. The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **Am J Clin Nutr**, v.71, p.1536–1544, 2000.

MARTIN, J. H. The collective electrical behavior of cortical neurons. The electroencephalogram and mechanisms of Epilepsy. In: **Principles of Neural Science**. 3. Ed. New York: Elsevier, 1991.

MELDRUM, B. S.; BALZAMO, E.; WADA, J. A.; VUILLON-CACCIUTTOLO. Effects of L-tryptophan, L-3, 4, dihydroxyphenylalanine and tranlylcypromine on the electroencephalogram and on photically induced epilepsy in the baboon, *Papio papio*. **Physiology & Behavior**, v.9(4), p.615-621, 1972.

MENCH, J. A. & SHEA-MOORE, M. M. Moods, minds and molecules: the neurochemistry of social behavior. **Appl Anim Behav Sci**, v.44, p.99–118, 1995.

METTINGVANRIJN, A. C.; PEPER, A.; GRIMBERGEN, C. A. High-quality recording of bioelectric events – part 1: Interference reduction, theory and practice. **Medical & Biological Engineering & Computing**. N. 28. (Sep.), p. 389- 397, 1990.

MINET-RINGUETA, J.; LeRUYETB, P. M.; TOMÉA, D.; EVEN, P. C. A tryptophan-rich protein diet efficiently restores sleep after food deprivation in the rat. **Behavioural Brain Research**, v.152(2), p.335-340, 2004.

MOORE, P.; GILLIN, J. C.; BHATTI, T.; DEMODENA, A.; SEIFRITZ, E.; CLARK, C.; STAHL, S.; RAPAPORT M.; KELSOE, J. Rapid tryptophan depletion, sleep electroencephalogram, and mood in men with remitted depression on serotonin reuptake inhibitors. **Arch Gen Psychiatry**; v.55: p.534-539, 1998.

MORGAN, W. W.; RUDEEN, P. K.; PFEIL, K. A. Effect of immobilization stress on serotonin content and turnover in regions of the rat brain. **Life Sci**, v.17, p.143–150, 1975.

MUGFORD, R. A. The influence of nutrition on canine behaviour. **J Small Anim Pract**, v.28, p.1046–1055, 1987.

NELSON, R. W. et al. Glucose tolerance and insulin response in normal weight and obese cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p.1357-1362, 1990.

PEREMANS, K.; AUDENAERT, K.; BLANCKAERT, P., et al. Effects of aging on brain perfusion and serotonin-2A receptor binding in the normal canine brain measured with single photon emission tomography. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.26, p.1393–1404, 2002.

PEREZ-CRUET, J.; CHASE, T.N. & MURPHY, D.L. Dietary regulation of brain tryptophan metabolism by plasma ratio of free tryptophan and neutral amino acids in humans. **Nature** v.148: p.693-695, 1974.

PERUGINI, M.; MAHONEY, C.; ILIVITSKY, V.; YOUNG, S. N.; KNOTT, V. Effects of tryptophan depletion on acute smoking abstinence symptoms and the acute smoking response. **Pharmacol Biochem Behav**, v.74(3), p.513-22, 2003.

POZEFSKY, T.; FELIG, P.; TOBIN, J. D.; SOELDNER, J. S. & CAHILL, G. F Jr. Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels. **J Clin Invest**, v.48, p.2273–2282, 1969.

PROAKIS, J. G.; MANOLAKIS, D. G.; Digital Signal processing.: Principles, algorithms and applications. 3rd ed. **New Delhi:Prentice Hall**, 2002.

PUIZILLOUT, J.J.; GAUDIN-CHAZAL, G.; Daszuta, A. et al. Release of endogenous serotonin from "encephale isole" cats. II. Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. **J Physiol (Paris)**, v.75: p.531-537, 1979.

RALEIGH, M. J.; BRAMMER, G. L.; McGUIRE, M. T. & YUWILER, A. Dominant social status facilitates the behavioral effects of serotonergic agonists. **Brain Res**, v348, p.274–282, 1985.

RODWELL, V. W. Protein & amino acid metabolism: conversion of amino acids to specialized products. In: **Review of Physiological Chemistry**, p. 430–439 [HA Harper, VW Rodwell and PA Mayes, editors]. Los Altos, CA: Lange Medical Publications, 1979.

ROUVINEN, K.; ARCHBOLD, S.; LAFFIN, S.; HARRI, M. Long-term effects of tryptophan on behavioural response and growing-furring performance in silver fox (*Vulpes vulpes*). **Appl Anim Behav Sci**, v.63, p.65–77, 1999.

SAAD, F. M. O. B.; SAAD, C. E. P. História evolutiva na alimentação dos cães e gatos. Lavras: UFLA/FAEPE. **Curso de pós-graduação “Lato Sensu” (Especialização) a distância – Nutrição e alimentação de cães e gatos**, 39p., 2005.

SAINIO, E.L.; PULKKI, K. & YOUNG, S. N. L-Tryptophan: biochemical, nutritional and pharmacological aspects. **Amino Acids**, v.10, p.21–47, 1996.

SAS Institute SAS/STATTM Guide for personal computers. Cary: **SAS Institute**, 1998.

SILVA JÚNIOR, J. W.; BORGES, F. M. O, MURGAS, L. D. S.; et al. Digestibilidade de Dietas com Diferentes Fontes de Carboidratos e sua Influência na Glicemia e Insulinemia de Cães. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 436-443, mar./abr., 2005.

SILVA, A. C. S. Aplicação de técnicas de processamento digital de sinais na caracterização de sinais cerebrais de bovinos. 2005. 106f. **Dissertação de (mestrado)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SILVA, F. L. EEG analysis: theory and practice. In: Basic Principles, clinical applications and related fields. 3ed. **Williams & Wilkins**, 1993b.

SPRING, B.; CHIODO, J. & BOWEN, D. J. Carbohydrates, tryptophan, and behavior: a methodological review. **Psychol Bull**, v.102, p.234–256, 1987.

TOAZZA, A. L. Sistema micro-controlado para medição de impedância pele-eletrodo em registradores bioelétricos. Florianópolis. **Dissertação de mestrado** (mestrado em engenharia elétrica) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

WEBSTER, J. G. Medical instrumentation – Application and Design. 2ed. Houghton Mifflin, **Boston**, 1992.

WELD, K. P.; MENCH, J. A.; WOODWARD, R. A.; BOLESTA, M. S.; SUOMI, S. J.; HIGLEY, J. D. Effect of tryptophan treatment on self-biting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Neuropsychopharmacology** v.19, p.314–321 1985.

YOUNG, S. N. Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: basic and clinical aspects. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 20, p.313–323, 1996.

YOUNG, S.N. & GALTHIER, S. Effect of tryptophan administration on tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid and indoleacetic acid in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.44, p.323-328, 1981.

YUWILER, A.; OLDENDORF, W. H.; GELLER, E. & BRAUN, L. Effect of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. **J Neurochem**, v.28, p.1015–1023, 1977.