



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

# Uso de Ansiolíticos Naturales para Mejorar el Bienestar Animal de Perros en Colectivos

Adriana Lucía Perea Lugo



Universitat Autònoma  
de Barcelona

## **Uso de Ansiolíticos Naturales para Mejorar el Bienestar Animal de Perros en Colectivos**

Tesis para la obtención del grado de Doctora en Ciencias  
**presentada por Adriana Lucía Perea Lugo**

Bajo la dirección de:

**Dr. Xavier Manteca Vilanova & Dra. Marta Amat Grau**

Programa de Doctorado en Producción Animal del Departamento de Ciencia Animal y de los  
Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, 2018



---

FACULTAT DE VETERINÀRIA

---

**Xavier Manteca Vilanova**, catedrático d'universitat del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona, i **Marta Amat Grau** professor investigador del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifiquen:

Que la tesis titulada “**Uso de Ansiolíticos Naturales para Mejorar el Bienestar Animal de Perros en Colectivos**”, presentada per Adriana Lucía Perea Lugo amb la finalitat d'optar al grau de Doctora en Veterinària, ha estat realitzada sota la seva direcció i, considerant-la acabada, autoritzen la seva presentació perquè sigui jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signen la present a Bellaterra, Noviembre de 2018.

Dra Marta Amat Grau

Dr. Xavier Manteca Vilanova

Adriana Lucía Perea Lugo

Doctoranda

*Papá*

*Te dedico no sólo lo escrito,  
sino precisamente todo aquello que no lo está*



## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores **Marta Amat** y **Xavier Manteca**. Por su invaluable ayuda, consejos y apoyo durante la elaboración de este estudio. Ellos quizá no lo recuerden, pero un día viajé de Zacatecas a México ida y vuelta (16 h) para escucharles en una charla de una hora y poderles conocer. Desde el momento que sentada en ese auditorio sentí como Xavi hablaba sobre bienestar animal, mis dudas sobre en qué disciplina y con quién realizar los estudios de doctorado quedaron resueltas. Dos años después viajé otras 14 horas, pero cambiando de continente para poder aprender de ellos. Nunca me cansaré de repetir que la profundidad de su conocimiento, la generosidad de su espíritu y la pasión con la que transmite lo que estudia, lo convierten en uno de los dos mejores profesores que conozco. El otro es mi padre.

Está claro que uno enseña lo que ES, no sólo lo que sabe.

Agradezco a todos los compañeros del grupo de Etología y a los responsables de la granja de la UAB que han enriquecido esta experiencia académica de una manera impresionante. **Ana, Camino, Deborah, Eva, Elena, José Luis, Heng-Lu, Oriol, Marina, Marta, Sergio, Sonia, Tomás...** de todos he aprendido mucho.

A todo el personal académico-administrativo del Departamento de Producción Animal, mis más sinceros agradecimientos por todo. Asimismo, por su apoyo durante la parte experimental, pero sobretodo por su alegría y dedicación a **Paula, Cristina, Raquel y Marta**.

Por su compañía, consejo, apoyo y amistad, agradezco a todos mis compañeros de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Especialmente a **Paco, Marco, Melba, Héctor, Alberto, Pedro, Luis, Carlos, José Juan, Ildelfonso, Jesús, Blanquita y Heriberto**.

A los **amigos** que han sido alegría, consuelo, apoyo y cordura. Harán que en México eche de menos Barcelona: Ana, Enric, Marc, Silvia, Eider, Eric, Luisi, Ana, Camino, Sergio, Lupita, Lili, Diego, Abi, Mely, Claudio, Ismael, Saúl, Pepe, Rodrigo, Cynthia, Samara, Gisela, Paula, Anita, Omar, Natalia, Estitxu, Foly, Mara, Mariona. Pero también a aquellos que a pesar de los kilómetros, diferencia horaria y años, no dejaron de *estar*: Paulina, Rodrigo, Fernanda, Gaby, Paty, Paco, César, Adriana, Blanca, Javier, Angie, Floyd, Horacio, JCarlos, JRicardo, Omar... No quiero imaginar la vida sin ustedes. Su existencia hace que la amistad cobre vida.

A las familias **Guerra y Morán**, a Antonia y Manuel por acogerme como una más en su casa y en su seno. A **Carlos** por su compañía, su cariño, su ejemplo, su ayuda, por compartir conmigo su cultura, su cocina, su tiempo y su espacio. Por arroparme los días de frío (y aguantarme los días de calor), por cantarme en los días tristes, por Pibil, por enseñarme y practicar a mi lado el significado de la paciencia y ser el mejor compañero en esta etapa.

He querido dejar al final de estas palabras a mi **Familia**. Porque cuando comienzo a escribir sobre ellos las lágrimas son inevitables... No sólo son lo más valioso en mi vida, lo son todo; mi ejemplo, mi fortaleza, mi razón y mi centro. El remanso al que se vuelve sin haberse ido, mi brújula y mi faro, la alegría de mi pasado y mi presente, mi consuelo, mi refugio y mi raíz. Los amo.

A mis hermanos **Luli, Paty y Víctor**. Por sus cercanía, su amor, su ayuda, complicidad y vida. **A mis padres, Lourdes y Víctor**... Porque es hasta mucho más tarde en la vida, cuando la piel pierde tersura y las rodillas comienzan a crujir, que los hijos entendemos que cada día de nuestras historia y cada pequeño o gran logro, se asientan -piedra sobre piedra- sobre de las historias de nuestras madres y padres. Son y siempre seran las dos personas que admiraré más en este mundo, por su integridad, su lucha y superación, su calidez, humor, bondad, tesón, humildad, generosidad y ser el reflejo de todo lo bueno que puede haber en la humanidad.

A todos los **animales** que, voluntaria o involuntariamente han compartido su vida o parte de ella a mi lado.

A mis **alumnos**, pasados y futuros. Por enseñarme tanto y ser el motor para nunca dejar de aprender.

## RESUMEN

Los perros en colectivos (refugios, perreras, criaderos, instalaciones de investigación) se enfrentan a una serie de condiciones subóptimas que comprometen su bienestar. En esta tesis se analizó el efecto de dos productos ansiolíticos naturales (una feromona apaciguadora sintética y un nutraceutico) sobre indicadores de bienestar, tanto de comportamiento como fisiológicos (concentración de cortisol en el pelo). Se observó que la exposición a la feromona sintética redujo la presencia de conductas repetitivas asociadas a estrés crónico: *pacing* ( $P < 0,0001$ ), *standing in rear legs* ( $P = 0,02$ ), así como ladridos ( $P = 0,014$ ) y vocalizaciones en general ( $P < 0,0001$ ). Además, la exposición a la feromona aumentó dos conductas relacionadas con las emociones positivas [interacción social ( $P = 0,007$ ), juego con perro ( $P = 0,03$ ) y con juguete ( $P < 0,0001$ )]. La administración del nutraceutico aumentó la frecuencia de conductas motoras: *bouncing* ( $P = 0,016$ ), *jump* ( $P < 0,0001$ ), *standing* ( $P < 0,0045$ ), *standing in rear legs* ( $P = 0,0002$ ), *sit* ( $P = 0,015$ ), *exploring* ( $P = 0,0023$ ) y *hide* ( $P = 0,009$ ) y disminuyó dos conductas orales asociadas a emociones negativas bostezo ( $P = 0,037$ ) y lamido de labios ( $P = 0,017$ ). La concentración de cortisol en pelo aumentó durante la aplicación de la feromona ( $P < 0,0068$ ) y no mostró cambios en respuesta al nutraceutico ( $P = 0,927$ ). Los resultados de ambos estudios muestran que estos ansiolíticos naturales tienen la capacidad de modificar la conducta en los perros que viven en colectivos y enfatizan la importancia de combinar indicadores de comportamiento y fisiológicos en los estudios cuyo objetivo es evaluar el bienestar de los animales.

## ABSTRACT

Dogs in groups (shelters, kennels, laboratory or research facilities) often face suboptimal living conditions that compromise their welfare. In this thesis, the effect of two natural anxiolytic products (a synthetic pheromone and a nutraceutical) on behavioural and physiological (concentration of cortisol in hair) indicators of welfare was studied. It was observed that the exposure to the synthetic pheromone reduced the presence of repetitive behaviours associated with chronic stress: pacing ( $P < 0.0001$ ), standing in rear legs ( $P = 0.02$ ), as well as barking ( $P = 0.014$ ) and general vocalizations ( $P < 0.0001$ ). In addition, two behaviours related to positive emotions [social interaction ( $P = 0.007$ ) play with dog ( $P = 0.03$ ) or with toy ( $P < 0.0001$ )] increased. The administration of the nutraceutical increased the frequency of locomotor behaviours: bouncing ( $P = 0.016$ ), jump ( $P < 0.0001$ ), standing ( $P < 0.0045$ ), standing in rear legs ( $P = 0.0002$ ), sitting ( $P = 0.015$ ), exploring ( $P = 0.0023$ ) and hide ( $P = 0.009$ ) and decreased two oral behaviors associated with negative emotions [yawn ( $P = 0.037$ ) and lip licking ( $P = 0.017$ )]. Hair cortisol concentration increased during the pheromone application ( $P < 0.0068$ ) and showed no significant changes due the nutraceutical administration ( $P = 0.927$ ). The results of both studies show that these natural anxiolytics do have the ability to modify behavior in dogs that live in groups. The results also emphasize the importance of combining behavioural and physiological indicators in studies aimed at assessing animal welfare.

## TABLA DE CONTENIDOS

**AGRADECIMIENTOS**  
**RESUMEN**  
**ABSTRACT**  
**TABLA DE CONTENIDOS**  
**INDICE DE CUADROS**  
**INDICE DE FIGURAS**

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1. ¿Qué es el Bienestar Animal?</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2. Importancia del estudio del Bienestar Animal</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3. Principales problemas de BA en perros de colectivos</b> .....	<b>17</b>
1.3.1. Ambiente pobre .....	17
1.3.2. Tamaño y diseño de la jaula .....	18
1.3.3. Privación social.....	18
1.3.4. Personal y manejo .....	18
1.3.5. Poca actividad física .....	18
1.3.6. Enfermedad o salud debilitada .....	18
1.3.7. Temperatura.....	18
1.3.8. Ruido .....	18
<b>1.4. Indicadores de Bienestar Animal en Perros</b> .....	<b>19</b>
1.4.1. Indicadores comportamentales de BA.....	19
1.4.2. Indicadores fisiológicos de BA.....	24
<b>1.5. Estrategias para mejorar el BA en perros dentro de colectividades</b> .....	<b>24</b>
1.5.1. Feromonas.....	25
1.5.2. Nutracéuticos .....	26
<b>II. OBJETIVO</b> .....	<b>28</b>

<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO I. Efecto de una feromona de apaciguamiento sintética (Adaptil® spray)</b>		
<b>sobre el bienestar de perros en colectivos. ....</b>		
<b>I.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>38</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.</b>	<b>¿Qué son las Feromonas?.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.</b>	<b>Producción y Detección de Feromonas en Mamíferos. ....</b>	<b>39</b>
<b>2.3.</b>	<b>Tipos de Feromonas.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.</b>	<b>Feromonas Sintéticas.....</b>	<b>41</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.</b>	<b>Instalaciones.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.</b>	<b>Animales. ....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Criterios de inclusión y exclusión .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.</b>	<b>Manejo.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.</b>	<b>Test de Acercamiento .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.</b>	<b>Diseño del Experimento .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.</b>	<b>Observación de Conducta.....</b>	<b>45</b>
<b>3.7.</b>	<b>Aplicación de la Feromona Sintética .....</b>	<b>48</b>
<b>3.8.</b>	<b>Toma de Muestra y Determinación de Concentración de Cortisol en Pelo.....</b>	<b>48</b>
<b>3.8.1.</b>	<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>49</b>
<b>3.9.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>3.9.1.</b>	<b>Test de acercamiento .....</b>	<b>50</b>
<b>3.9.2.</b>	<b>Efectos en la conducta .....</b>	<b>50</b>
<b>3.9.3.</b>	<b>Determinación de la concentración de Cortisol en Pelo.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.</b>	<b>DISCUSION .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.</b>	<b>Diseño .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.</b>	<b>Test de acercamiento.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.</b>	<b>Observación de la Conducta .....</b>	<b>57</b>

4.4.	Determinación de la Concentración de Cortisol en Pelo.....	59
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 1 .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 2. Efecto de un nutraceutico (Adaptil® comprimido express) sobre el bienestar de perros en colectivos. ....</b>		
		<b>68</b>
<b>I.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>69</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>70</b>
2.1.	Alimentos Funcionales y Nutraceuticos. ....	71
2.2.	Alimentación, compuestos nutraceuticos y conducta.....	71
2.3.	Adaptil® comprimidos express .....	72
2.3.1.	Triptófano.....	72
2.3.2.	L-Teanina .....	73
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>74</b>
3.1.	Instalaciones.....	74
3.2.	Animales .....	75
3.2.2.	Diseño del Experimento .....	75
3.2.3.	Test de acercamiento .....	77
3.2.4.	Observación de conducta.....	77
3.2.5.	Administración de Adaptil® express comprimidos .....	81
3.2.6.	Toma de muestra de pelo y determinación de concentración de cortisol .....	81
3.2.7.	Análisis Estadístico .....	82
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
4.1.	Test de acercamiento.....	83
4.2.	Conducta .....	83
4.3.	Toma de muestra de pelo y determinación [C].....	87
<b>V.</b>	<b>DISCUSION .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Diseño experimental .....	89
5.2.	Administración del nutraceutico Adaptil.....	89
5.3.	Test de acercamiento.....	89

5.4.	Observación de la Conducta .....	90
5.4.1.	Toma de muestra de pelo y determinación de concentración de cortisol .....	91
VI.	CONCLUSIONES .....	93
VII.	BIBLIOGRAFÍA ADAPTIL NUTRACÉUTICO .....	94
VIII.	DISCUSIÓN GENERAL.....	100
8.1.	Test de acercamiento.....	100
8.2.	Uso de la determinación de cortisol en pelo como indicador de estrés crónico en perros 100	
8.3.	Uso de ansiolíticos naturales para mejorar el bienestar de perros en colectivos.....	101
	CONCLUSIONES GENERALES .....	106

## **ANEXO A**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Situación anatómica del OVN en el perro .....	40
Figura 2. Canil de los perros .....	42
Figura 3. Instalaciones de la Granja de la FV .....	42
Figura 4. Diseño del Experimento .....	45
Figura 5. Zona elegida para la muestra de CP .....	48
Figura 6. Frecuencia de conductas durante ambos tratamientos .....	52
Figura 7. Conductas con diferencia significativa entre tratamientos .....	53
Figura 8. Concentración de cortisol en Pelo con y sin Feromona .....	54
Figura 9. Canil de los perros .....	74
Figura 10. Localización de la granja de perros de la FV.....	74
Figura 11. Diseño del experimento con Adaptil Comprimidos Express .....	76
Figura 12. Zona elegida para la muestra de CP .....	81
Figura 13. Media de conductas con y sin Adaptil® Express .....	86
Figura 14. Comportamientos con diferencias significativas entre tratamientos.....	87
Figura 15. Concentración de Cortisol en Pelo con y sin Nutraceutico .....	88

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos de los perros que participaron en el estudio .....	43
Cuadro 2. Valores para el Test de Acercamiento .....	44
Cuadro 3 Descripción del modelo experimental.....	44
Cuadro 4. Etograma.....	45
Cuadro 5. Descripción de los parámetros comportamentales .....	47
Cuadro 6. Reacción de los perros ante la presencia de un desconocido .....	50
Cuadro 7. Resultados de la observación comportamental .....	51
Cuadro 8. Concentración de cortisol en pelo con y sin Adaptil spray.....	54
Cuadro 9. Concentración de cortisol en pelo con y sin Adaptil spray) .....	54
Cuadro 10. Composición de Adaptil® express. Fuente: CEVA laboratorios .....	72
Cuadro 11. Perros que participaron en el estudio .....	75
Cuadro 12 Descripción del modelo experimental.....	76
Cuadro 13. Valores para el Test de Acercamiento .....	77
Cuadro 14. Etograma .....	78
Cuadro 15. Descripción de los parámetros comportamentales .....	80
Cuadro 16 Reacción de los perros ante un desconocido .....	83
Cuadro 17. Valores medios de conductas entre tratamientos .....	85
Cuadro 18. Concentración de Cortisol en Pelo con y sin Adaptil Nutraceutico .....	87

## ABREVIACIONES

[C]	Concentración de cortisol
[CP]	Concentración de cortisol en pelo
[CS]	Concentración de cortisol en saliva
aa	Aminoácido
AC	Adaptil comprimidos
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AN	Adaptil nutracéutico
AS	Adaptil spray
BA	Bienestar animal
CAP	Cat appeasing pheromone/Feromona apaciguadora felina
CP	Cortisol en Pelo
DAP	Dog appeasing pheromone/Feromona apaciguadora canina
dL	Decilitro
EA	Enriquecimiento ambiental
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay/ ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FC	Frecuencia cardíaca
FV	Facultad de Veterinaria
HPA	Hipotalámico-pituitario-adrenocortical
MOE	Main olfactory epithelium/Epitelio olfatorio primario
OBP	Odorant binding protein/ Proteína ligadora a olor
OVN	Órgano vómero nasal
PAP	Pig appeasing pheromone/Feromona apaciguadora porcina
SNC	Sistema nervioso central
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
µg	Microgramo
FEEDAP	Panel de la EFSA sobre aditivos y productos o sustancias utilizados en la alimentación animal
WHO	World health organization/ Organización mundial de la salud
GABA	Gamma aminobutyric acid/ ácido gamma aminobutírico

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La domesticación supuso un cambio de vida y una serie de beneficios tanto para el humano como para los otros animales. La palabra inglesa husbandry (cuidado, manejo y crianza de animales) se deriva de 'hus' y 'bond': casa y unión (Temple, 2009). Desde entonces, los animales se unieron al entorno humano y fueron ubicados en el ambiente que estos consideraban ideal incluso para sí mismos: su hogar. La esencia de esta crianza y uso fue la atención y la convivencia entre el humano y “sus” animales, avenencia que articuló a partir de entonces una estrecha relación simbiótica.

De entre todas las especies domesticadas, la canina fue la primera y la que desde entonces se ha adoptado para satisfacer más necesidades humanas que cualquier otra (Beaver, 2009b). Dondequiera que haya humanos hay perros; Faulkner (2013) estimó que existe un can por cada 10 habitantes en el planeta. Y, aunque en su censo real es un desafío, la WHO (2012) estimó la población mundial canina en 525 millones. Basándose en esa valoración, hoy en día se presume que dicha cantidad se ha incrementado a cerca de 900 millones.

La interacción y/o tenencia de un perro, ha reportado múltiples beneficios para la salud y bienestar humano, por ejemplo: reducción en los niveles de ansiedad, presión arterial y frecuencia cardiaca, disminución de sentimientos de soledad en ancianos, menor incidencia de rinitis alérgica, asma y eczema en niños, aumento de la actividad física, aumento en la frecuencia de interacciones sociales, mejor desarrollo emocional y cognitivo (Hall, 2017). La domesticación y este vínculo único interespecie también ha cambiado a los perros de manera tan drástica, que no sólo son capaces de lidiar con el estilo de vida de las personas, sino que pueden haberse adaptado específicamente a él (Kamiski *et al*, 2014), pese a que el entorno humano es cada vez más complejo y cambiante (Mills *et al.*, 2005). Los perros cohabitan con las personas dentro de sus casas, comparten su día, aficiones, transporte y estilos de vida. En algunas culturas, más que animales de compañía forman parte de la familia.

Sin embargo, cuando los perros viven en grupos y en un contexto diferente al que tienen como mascotas (por ejemplo un refugio, instalaciones de laboratorio o investigación), se enfrentan a una serie de condiciones y desafíos que tienen un impacto importante en su bienestar. La existencia de estas instalaciones colectivas son un hecho necesario, y aunque generalmente se trata de hacer todo lo posible para garantizar que los animales tengan una buena adaptación al entorno, y una buena calidad de vida (Waran, 2017), pueden suscitarse problemas de bienestar que pueden ser difíciles de evitar.

### 1.1. ¿Qué es el Bienestar Animal?

El bienestar animal (BA) más que un término, es un concepto amplio y abstracto que fue empleado por primera vez en 1926 (Mills, 2010). Su estudio se lleva a cabo principalmente como parte de las

ciencias naturales, pero, debido al papel que desempeñan los animales en la esfera humana, su interacción con las sociales es ineludible.

La percepción, interpretación y evaluación moral del estado de bienestar en un animal y sus problemas más comunes están influenciados por el contexto social, especialmente por sus valores y comprensión moral (Carenzi, 2009). Al diferir estos valores entre regiones, culturas, tiempo e individuos (Ohl, 2012) se convierte en un estudio dinámico (Carenzi, 2009) más relacionado con la ética que con el concepto científico del BA (Broom, 2011).

Sobre una base científica, se han seguido tres enfoques principales para definirle y encontrar metodologías que lo evalúen:

El primer enfoque enfatiza la función o el adecuado funcionamiento biológico de un organismo. Bajo esta visión, un buen nivel de bienestar significaría la ausencia de enfermedad, lesión o falta de confort térmico (Duncan, 2005).

El segundo destaca lo que el animal siente reconociendo el papel de los aspectos psicológicos, los procesos mentales y considerando las emociones como elementos clave para determinar la calidad de vida (Duncan, 2005). Aunque la mayoría de los especialistas concuerdan que lo anterior es importante, precisar y medir el bienestar mental o emocional de un individuo con la rigidez del método científico es complejo (Temple, 2009) Por ahora, es viable estudiar los vínculos que las emociones tienen con las necesidades biológicas de un animal y las implicaciones de cubrirlas o no, tratando de evitar interpretaciones antropomórficas (Carenzi, 2009).

El último, subraya el comportamiento innato del individuo estableciendo que un animal tendrá un bienestar pobre si no puede desarrollar la conducta propia que su especie ha desarrollado durante el proceso natural de evolución. Aunque el repertorio conductual de los animales domésticos difiera del de sus ancestros debido a los cambios impuestos durante el proceso de domesticación (Duncan, 2005).

En 1993, combinando elementos de esos tres enfoques, el Consejo de Bienestar de Animales de Granja del Reino Unido propuso las llamadas Cinco Libertades. Aunque se desarrollaron principalmente para animales usados en la producción, su uso también se expande a los animales de compañía (Sandøe, 2016). Estas libertades enuncian que el BA, aunque intangible, es adecuado y se preserva si los animales se mantienen libres de: 1) padecer hambre y sed, 2) incomodidad térmica y física, 3) lesiones, enfermedad, dolor o sufrimiento, 4) miedo o estrés y 5) expresar patrones de comportamiento específicos de su especie. Las primeras cuatro fueron formuladas desde la perspectiva de que la ausencia de estados negativos asegura bienestar; mientras que la quinta implica que los aspectos positivos contribuyen al mismo. Hoy en día, para el estudio del BA se considera cada vez más la presencia de estos últimos (Yeates, 2008).

En conclusión, la definición más amplia de BA debe incluir el estado integral de un animal y aquellos factores relacionados con el entorno en el que viven. Los indicadores usados para evaluarlos deben basarse en la etología conocida de la especie y validarse científicamente (Carenzi, 2009).

## **1.2. Importancia del estudio del Bienestar Animal**

El interés por el comportamiento, salud y bienestar de los perros es un tema de interés popular y cada vez más reconocido dentro de una gran variedad de disciplinas. Ello ha incrementado tanto la calidad de la investigación relacionada, como su aplicación durante los últimos 50 años. Esto supone también un desafío para ambas especies, ya que involucra la identificación, prevención y atención de los problemas de conducta derivados de la adaptación del perro al entorno (Sherman, 2008) y a los estándares de manejo que el humano establece (Stellato, 2017). Este vínculo puede deteriorarse cuando el perro muestra conductas percibidas como inaceptables, como eliminación inadecuada, vocalización excesiva, destrucción o agresividad (Beerda, 2000).

En el caso de perros destinados para docencia o investigación, el estudio del BA es importante debido a su innegable vínculo con la producción de datos de alta calidad científica. Si su bienestar se encuentra comprometido se pueden llegar a conclusiones poco sólidas y a la reducción en la sensibilidad, fiabilidad o repetitividad de los resultados obtenidos (Boissy *et al.*, 2007).

En síntesis, la observación y estudio de la conducta canina en cualquier contexto permite detectar problemas de bienestar existentes. Una vez identificados deben de ser estimados mediante indicadores que lleven al desarrollo de estrategias adecuadas para mejorarlo.

## **1.3. Principales problemas de BA en perros de colectivos**

Aunque los problemas de BA en perros son comunes entre todos los individuos y en cualquier contexto, existen variaciones importantes de acuerdo al entorno en el que vivan. Aquellos que lo hacen en instalaciones colectivas, generalmente reciben agua, comida, atención veterinaria y protección contra la depredación o conflictos con otros animales, pudiendo ser más saludables y longevos que aquellos en otras condiciones (Péter, 2018). Sin embargo, el ambiente de confinamiento suele ser estresante (Beerda, 1999) y provocar el desarrollo de problemas de comportamiento que suponen un riesgo para su bienestar.

La respuesta de un perro ante las condiciones de confinamiento, difiere enormemente entre individuos (Boissy *et al.*, 2007). Factores como la edad (Yin, 2004), el tiempo en las instalaciones (Fragó, 2010) y experiencias anteriores, influyen esta respuesta (Pongrácz, 2010). En general los siguientes son algunos de los problemas a los que se enfrentan los perros en colectivos.

### **1.3.1. Ambiente pobre**

En confinamiento, la falta de previsibilidad, control y elección origina en los perros estrés, ansiedad, frustración o miedo (Weiss, 2012) . Si la ausencia de estímulos y de un ambiente complejo o la restricción a ellos es severa y crónica, la flexibilidad neuronal, cognitiva y conductual pueden verse afectadas (Stellato *et al.*, 2017).

### **1.3.2. Tamaño y diseño de la jaula**

Siendo la jaula el lugar en el cual el perro permanece una gran parte de su vida, ésta tiene un impacto trascendental en su conducta y bienestar (Döring et al., 2016). Su diseño debe promover comportamientos propios de la especie, facilitar la interacción con otros perros y permitir la formación de grupos sociales (Beerda et al., 1999).

### **1.3.3. Privación social**

El aislamiento social puede ser más determinante que la restricción espacial para el BA de los perros (Wemelsfelder, 2014). La creación de grupos y el contacto social son tan importantes (Burn, 2017) que estos animales pueden llegar a mostrar alteraciones de conducta en su ausencia (Broom, 2015), situación habitual en perros confinados (Hubrecht, 2010).

### **1.3.4. Personal y manejo**

Cualquier persona involucrada en el manejo de los perros en colectivo, debe tener un entrenamiento técnico y comprensión básica del comportamiento individual y de la dinámica grupal de los perros con los que trabaja, ya que estas interacciones suelen ser las pocas, o las únicas, que el animal tiene durante toda su vida. Aumentar las habilidades en el manejo positivo de los perros beneficia tanto al personal como a los perros (Lloyd, 2017).

### **1.3.5. Poca actividad física**

El ejercicio proporciona estimulación física y mental, y da a los individuos la oportunidad de socializar. Su carencia ocasiona comportamiento estereotipados (Scullion, 2017).

### **1.3.6. Enfermedad o salud debilitada**

El estrés crónico tiene una interrelación crucial y compleja con la patología (Broom, 2015). Puede ocasionar inmunosupresión y susceptibilidad a enfermedades de diferente etiología (Scullion, 2017). La enfermedad afecta directamente al bienestar y a su vez puede ser el resultado de estrés crónico debido a factores como alimentación inapropiada, reagrupación, mal manejo del ambiente o el mismo confinamiento

### **1.3.7. Temperatura**

El confort térmico en el macro y microclima de los perros el colectividades es relevante para su desempeño rutinario. Los individuos sometidos a temperaturas poco confortables suelen presentar un incremento en conductas repetitivas y una reducción en la interacción con su ambiente (Mills, 2014).

### **1.3.8. Ruido**

Los perros son especialmente sensibles a los estímulos sonoros. En los perros confinados en grupo, las fuentes de ruido son muchas y su control o evitación es complicada.

## **1.4. Indicadores de Bienestar Animal en Perros**

Los indicadores que reflejan de manera confiable y objetiva el BA son fundamentales para trabajar sobre él, estimarlo y tomar decisiones relacionadas al mismo (Beerda *et al.*, 1999). Debido a que está inmerso en el terreno de las percepciones subjetivas del individuo, no puede ser determinado directamente (Haverbeke, 2015). Debe de realizarse un análisis sutil y detallado de las respuestas fisiológicas y comportamentales (Stellato *et al.*, 2017) a través de medidas previamente validadas en grado y eficiencia (Beerda, 1997).

El uso de cada indicador requiere una discusión crítica (Mills *et al.*, 2005), por ello al usarse en conjunto pueden proporcionar una evaluación más precisa (Beerda *et al.*, 1999). Para el objetivo de esta tesis, se analizó un indicador fisiológico: la concentración de cortisol en pelo y uno comportamental: análisis de etograma.

### **1.4.1. Indicadores comportamentales de BA**

Desde las investigaciones realizadas por el nobel Iván Paulov, la observación de la conducta ha sido considerada como un método válido y de fácil implementación en la experimentación científica. Se considera como el "gold standard" de la evaluación del BA debido a que se puede medir al instante y no entraña técnicas invasivas como las usadas en la recolección de muestras para los indicadores fisiológicos (Gaultier, 2005) particularmente si se usan nuevas tecnologías.

A pesar de la aceptación general sobre la capacidad de los animales para experimentar emociones negativas y positivas, el estudio del BA estuvo centrado durante mucho tiempo en las primeras (Yeates, 2008), quizá debido a que las manifestaciones de experiencias negativas son más intensas y fáciles de observar; mientras que las positivas son consideradas más lábiles y de expresión más sutil (Owczarczak-Garstecka, 2016).

#### **1.4.1.1. Indicadores de un BA negativo**

##### **a Estereotipias**

Una estereotipia se reconoce por ser una secuencia de movimientos repetidos varias veces con poca o nula variación, sin función aparente. Ocurren en situaciones en las cuales los individuos carecen de control de su ambiente. La secuencia de conducta que se convierte en estereotipia es, con frecuencia, una forma incompleta de una conducta funcional para remediar algún problema. Sin embargo, al momento que la estereotipia se establece, ya no ejerce ninguna función (Broom, 2011). Puede convertirse en hábito y persistir fuera de la situación que motivó su aparición, por lo que su presencia debe considerarse evidencia de un pobre bienestar experimentado en algún momento de la vida del individuo, y no necesariamente un indicador de su bienestar actual (Waren, 2016). A pesar de considerarse como uno de los indicadores más importantes de estrés crónico (Broom, 2015), no debe usarse como único índice de BA, ni deberá suponerse un bienestar óptimo en los sujetos que no las presenten (Held, 2011).

#### **b “Circling” o dar vueltas en circulo**

Se presenta como una actividad locomotora modificada en condiciones de movimiento limitado o espacio reducido (Boissy *et al.*, 2007). Se ha relacionado con niveles altos de excitación, discomfort térmico, aislamiento social y, si se presenta justo antes de que los perros defequen, con deseo frustrado de defecar lejos del área donde normalmente descansan (Faragó *et al.*, 2010). Se ha reportado una predisposición racial en el bulterrier inglés y pastor alemán (Luescher, 2004)

- “Pacing” o paseo de un lado a otro

El animal traza una ruta fija que regresa a su punto de origen y que repite con modificaciones menores. Se ha asociado ampliamente con el estrés crónico (Boissy *et al.*, 2007) y frustración (Broom, 2015).

#### **c Aumento de la actividad motora o hiperactividad**

Los perros alojados en condiciones austeras muestran altos niveles de actividad locomotora que suelen incrementarse después de cualquier leve perturbación o estímulo (Scalia, 2017; Travain *et al.*, 2015). Está relacionada con inquietud y dificultad para adaptarse a un nuevo entorno y problemas de aprendizaje (Beaver, 2010). La hiperactividad también puede ser un problema en los perros domésticos o los perros jóvenes considerados demasiado activos por propietarios relativamente sedentarios. Si llega al grado de ser patológica, la hiperactividad puede llegar a requerir tratamiento farmacológico. Los perros ansiosos suelen mostrar una elevada exploración ambiental y conductas de alerta por factores genéticos (Kuhne *et al.*, 2014).

#### **d Escarbar o rascar el suelo**

Es una conducta locomotora normal que puede convertirse en un problema de BA cuando su frecuencia es excesiva. Se ha vinculado con frustración al no poder realizar conductas altamente motivadas (Pageat *et al.*, 2007; Siracusa *et al.*, 2010) y se ha reportado en perros viviendo en espacios reducidos o socialmente aislados (Kovács, 2016; Rault, 2017).

#### **e Conductas de desplazamiento**

Son movimientos derivados de los patrones motores típicos de la especie pero que parecen ser irrelevantes tanto para el comportamiento anterior como para el posterior. Tienden a ocurrir en situaciones donde un animal está motivado para realizar dos o más comportamientos que están en conflicto uno con el otro (Part *et al.*, 2014). Por ejemplo, los perros confinados en condiciones austeras, o durante situaciones de estrés agudo, beben agua (o simulan hacerlo) cuando entran en conflicto sobre si acercarse o retirarse a una persona que se aproxima (Gaines, 2008; Siracusa *et al.*, 2010).

- “Auto grooming” o acicalamiento excesivo

Aunque es un comportamiento normal realizado para mantener sano el integumento, es la más común de las conductas de desplazamiento (Beaver, 2009). Su frecuencia se incrementa cuando el

animal está expuesto a estrés, a un cambio en sus rutina o a ambientes pobres (Cafazzo *et al.*, 2014). Puede indicar dolor o solicitud de atención y ocasionar dermatitis acral y desordenes en el sueño o en la alimentación (Sandri, 2015). Hay una predisposición al lamido de flancos en los Doberman Pincher y en razas grandes a la dermatitis acral (Hernández, 2012).

- **Bostezo**

Cuando no está asociado al sueño, es una posible conducta de desplazamiento que indica conflicto entre conspecíficos. También se atribuye a miedo, tensión (Waran, 2017) y estrés agudo o leve (Sandri *et al.*, 2015).

- f **“Shaking” o sacudir el cuerpo**

Esta conducta se ha relacionado con miedo (Ito *et al.*, 2005) o estrés agudo (Dawkins, 2004).

- g **“Tail chasing”, “whirling” o persecución de cola**

Se presenta en condiciones de hiperexcitación, frustración (Broom, 2015), falta de EA, deficiencia nutricional, ansiedad, intentos frustrados de escape, búsqueda de atención o enfermedades (Beaver, 2009). Parece que los Bullterrier inglés y Pastor Alemán muestran predisposición racial (Hernández, 2012).

- h **Ladrido o vocalizaciones excesivas**

El ladrido excesivo es uno de los cinco principales problemas de comportamiento según quejas de los propietarios (Beaver, 2009a). La cuantificación de su frecuencia y duración es importante para diferenciar entre lo normal y lo que no lo es (Mendl, 2009). El ladrido es uno de los medios de comunicación inherentes a los perros y pueden transmitir un amplio espectro de estados internos. Durante el proceso de domesticación, las vocalizaciones de los perros se han modificado de manera cuantitativa y cualitativa, de manera tal que los humanos parecen capaces de interpretarlos de manera más o menos confiable (Hall, 2015; Protopopova, 2016; Wells, 2009). Sin embargo, en confinamiento algunos tipos de vocalización suelen ocurrir en respuesta a situaciones estresantes, de aislamiento, aburrimiento, búsqueda de atención o espacio reducido (Pageat, 2010) e incluso, infecciones, dolor, ansiedad, e hiperactividad (Di Cerbo, *et al.*, 2017b). (Wyatt, 2009), categorizó los ladridos en subtipos basados en el contexto y (Faragó *et al.*, 2010) observó que existen diferentes características acústicas, entre los gruñidos de juego y aquellos relacionados con conductas agresivas. Los primeros tienen una frecuencia relativamente más baja, una menor dispersión y son más cortos. Ladridos de larga duración, con repeticiones rápidas e intervalos pequeños fueron categorizados como de perturbación (Brennan, 2006; Kekan *et al.*, 2017; Surov, 2016). Mientras que el trasfondo emocional del gimoteo se cree que está centrado en los estados negativos (Wyatt, 2009) o de miedo (Frank, 2010). Algunas razas, como los Beagles, muestran predisposición racial a las vocalizaciones excesivas.

## **i Coprofagia**

Se asocia con poca estimulación ambiental, aprendizaje, comportamiento exploratorio, deficiencia grave de tiamina o cobalamina (Amat, 2016) predisposición genética, baja digestibilidad de la dieta (Pageat, 2010) y estrés crónico (Landsberg, 2015). No se ha reportado diferencia con respecto a la distribución entre sexo, edad o dieta (Hernández, 2012). De acuerdo con Overall, (2018) un perro sucio por excrementos representa una fuente de estrés social y olfativo

## **j Apatía o Inactividad /Aburrimiento**

El aburrimiento crónico ineludible es una emoción desagradable que puede ser extremadamente aversiva e incluye niveles de excitación sub-óptimos y una motivación frustrada por experimentar casi cualquier cosa diferente o más excitante que los comportamientos y sensaciones en ese momento posibles (Hetts, 1992). Puede ser causado por privación social, monotonía espacial (entornos estériles) o temporal (tareas repetitivas) y evidenciarse por un aumento de la somnolencia, descanso insuficiente y conductas de evitación (Protopopova, 2018). Cuando el animal no consigue escapar de un estímulo estresor, se encuentra en un estado crónico de apatía y se puede presentar lo que se conoce como indefensión o impotencia aprendida. Esta se caracteriza por una disminución general en la capacidad de respuesta al entorno (Herron, 2014). Bajo estas circunstancias, el único indicador de un pobre bienestar es que el animal pasa más tiempo inactivo (Protopopova *et al.*, 2018).

## **k Agresividad**

El miedo y la frustración son dos de las razones más comunes para que un perro muestre interacciones agresivas (Denham, 2014). Aquellos alojados en instalaciones deficientes suelen mostrar más comportamientos de este tipo (Beerda *et al.*, 2000).

## **l Conductas Orales**

Aunque son típicamente realizadas en un contexto social, pueden considerarse como un signo común de inquietud o ansiedad en perros (Protopopova, 2016). Entre las más comunes están “lip licking” o lamido de belfos y lamido de jaula, que se ha relacionado con discomfort térmico (Protopopova *et al.*, 2018).

- **Lip Licking**

Parece estar asociado a contextos negativos, como miedo (Stellato *et al.*, 2017), exposición a ruidos (Herron *et al.*, 2014), o como respuesta a incertidumbres físicas y sociales. También puede ser una respuesta conductual afectiva ante expresiones faciales negativas de otro individuo (perro o humano) (Albuquerque, 2018).

### **1.4.1.2. Indicadores positivos**

El estudio de las emociones positivas en los animales es primordial para el avance de la ciencia del BA (Yeates, 2008). Varios comportamientos han demostrado ser útiles para dicho fin, entre ellos:

#### **a Descanso**

Los perros pasan aproximadamente el 50% de su tiempo durmiendo y el 20% del sueño total en el sueño REM (Manteca, 2002). Esta capacidad de descanso está relacionada con menos conductas repetitivas, adaptación al medio ambiente, con un sesgo de juicio positivo y con un incremento en las conductas afiliativas (Dawkins, 2004). Su utilidad como indicador de bienestar es controvertido, ya que puede ser que se logre un mejor bienestar descansando y durmiendo o que el descanso y sueño sean una consecuencia de un mejor bienestar (Fragó *et al.*, 2010).

#### **b Interacción social**

El hecho de que los perros muestren un comportamiento normal para su especie en los sistemas de confinamiento es un indicador importante de su bienestar (Sandri, *et al.*, 2015). Al ser una especie altamente social, aumentar el contacto entre ellos los mantiene activos y mejora su calidad de vida.

#### **c Juego**

A pesar de conllevar un costo en tiempo y energía, el juego tiene beneficios inmediatos y a largo plazo para los animales que lo realizan. Ha sido identificado como un indicador potencial de un buen bienestar debido a que desaparece cuando los animales están bajo desafío físico y debido a que por sí mismo causa emociones positivas y se desarrollan conductas propias de la especie (Bradshaw, 2015). Posee la tendencia a propagarse a otros individuos, lo que puede resultar en una acumulación contagiosa de juego en grupo (Protopopova, 2016) y bienestar colectivo.

#### **d “Allo grooming” o aseo compartido**

Esta conducta tiene un papel clave en las interacciones denominadas socio-positivas. Su función es tanto de mantenimiento higiénico como social, ya que refuerza los vínculos y reduce la tensión en grupos de animales (Di Cerbo, *et al.*, 2017b).

#### **e Vocalización**

Algunas señales vocales pueden ser un indicador positivo de BA porque ocurren durante contextos que se consideran placenteros (como el sexo o el juego), y a que son inhibidos durante situaciones negativas. Su estudio minucioso puede determinar las diferencias acústicas existentes entre las vocalizaciones relacionadas con indicadores de bienestar positivo y conductas agonísticas (Herron *et al.*, 2014).

#### **f “Paw” o suspensión de pata delantera.**

Se reporta en perros con restricción social crónica o como respuesta individual ante el estrés.

#### g “Shaking” o sacudir el cuerpo.

Esta conducta puede ayudar al perro a aliviar la tensión (Pastore *et al* 2011)

#### h Persecución de cola.

Se presenta generalmente cuando el perro está sobreexcitado o frustrado

### 1.4.2. Indicadores fisiológicos de BA

La observación de las conductas para determinar estrés en animales puede llegar a ser una herramienta muy útil, pero también subjetiva. La interpretación se considera más completa cuando se determinan también medidas fisiológicas. Entre ellas se encuentra la evaluación de constantes fisiológicas como la temperatura (Wells, 2009) y la frecuencia cardiaca y respiratoria (Protopopova, 2016), así como la determinación de los niveles de prolactina (Cobb, 2016), oxitocina (Meyer, 2014), creatinina (Touma, 2005), células de la línea blanca (Roth, 2016), metabolitos reactivos al Oxígeno (Blackwell, 2010), glucocorticoides (cortisol / corticosterona) y catecolaminas (adrenalina / noradrenalina) (Glenk *et al.*, 2014). Para esta tesis, se usó como indicador fisiológico de BA la concentración de cortisol en pelo.

El cortisol se ha utilizado como uno de los indicadores más sobresalientes de estrés agudo y crónico (Mills *et al.*, 2005) y es considerado como un biomarcador representativo, fiable (Rakotoniaina *et al.*, 2017) y con una gran disponibilidad debido a que es sintetizado por el cerebro, placenta, ovario, testículo, útero, glándula mamaria y timo de mamíferos (Ito *et al.*, 2005). Sus niveles se incrementan cuando el animal está en una situación estresante (Dawkins, 2004) y en actividades de excitación emocional, tales como comer o copular (Mendl *et al.*, 2009).

### 1.5. Estrategias para mejorar el BA en perros dentro de colectividades

Las intervenciones y estrategias destinadas a mejorar el entorno físico o social de los animales en albergues, refugios o laboratorios con el objetivo de evitar o disminuir el estrés, y en general mejorar su BA son variadas; entre ellas las más comunes son:

- a) Modificación de conducta (Demontigny-Bédard, 2018)
- b) Manejo y enriquecimiento ambiental (Hubrecht, 1993) (Hall *et al.*, 2015; Protopopova, 2016; Wells, 2009)
- c) Administración de fármacos psicotrópicos (Hernández, 1999).
- d) Administración de ansiolíticos naturales (feromonas sintéticas (Pageat, 2010), nutraceuticos, (Di Cerbo, *et al.*, 2017b) entre otros (Taylor, 2007))

El uso de terapias naturales es una tendencia en aumento. En la década de los 90's se incrementó cerca del 400% en humanos. Ello motivó a que la OMS (OMS, 2002) publicara pautas para tratar los

temas asociados con la política, la seguridad, la eficacia, la calidad, el acceso y el uso racional de la medicina tradicional, complementaria y alternativa. En la década pasada cerca del 30% de los dueños de mascotas usaban o consideraban su uso en sus animales y un número cada vez mayor de clínicas veterinarias comenzaron a comercializarlos (Boothe, 2004).

Entre las ventajas del uso de ansiolíticos naturales sobre los fármacos convencionales pueden mencionarse los siguientes:

- a) Suelen ser menos costosos que los psicofármacos, especialmente en terapias a largo plazo (como es el caso de los problemas de comportamiento).
- b) Pueden reducir la cantidad de medicamento necesaria para controlar las condiciones de algunas enfermedades (Schneider, 2013), (Gazzano, 2018).
- c) El acceso a ellos es más sencillo, ya que en algunas regiones no hay productos aprobados para el tratamiento de condiciones de comportamiento en mascotas (Orlando, 2018).
- d) Está documentado que la administración de algunos medicamentos psicotrópicos puede ocasionar efectos secundarios adversos como hipotensión, depresión cardíaca, bloqueo auriculoventricular, fatiga, somnolencia, misofonía, emesis, ataxia, convulsiones, bradicardia, entre otros (Sinn, 2018). Los productos naturales son consideradas más seguros y con menos efectos secundarios indeseables (Michel, 2006). Su prescripción no suele estar afectada por el historial médico del animal (Demontigny-Bédard, 2018).

Por lo anteriormente citado, en esta tesis se analizó el efecto de dos productos ansiolíticos naturales: una feromona apaciguadora sintética (Adaptil® spray) y un nutracéutico (Adaptil® comprimidos express) en una colectividad de perros.

### **1.5.1. Feromonas**

La palabra feromona proviene del griego “*pherein*”: transferir o transportar y “*hormon*”: excitar o estimular. Las feromonas son una subclase de semioquímicos (sustancias químicas involucradas en la comunicación animal) secretados al exterior por un individuo y recibida por un segundo de la misma especie, en el cual se desencadena una reacción específica, una conducta definitiva o el desarrollo de un proceso (Wyatt, 2009). En mamíferos son excretadas principalmente por glándulas especiales de la lana, pelo o piel (como las perineales, sudoríparas o sebáceas) o exteriorizadas mediante la orina, heces, secreciones vaginales o cervicales y saliva (Archunan, 2018).

Estas sustancias influyen en conductas vitales para el éxito reproductivo y mantenimiento de la especie (Brennan, 2006; Kekan *et al.*, 2017; Surov, 2016) y se han clasificado de acuerdo a su función, por ejemplo: feromonas sexuales, de alarma, de congregación, maternas, etc (Wyatt, 2009). Si bien en mamíferos se han identificado pocas (Frank *et al.*, 2010), éstas últimas han sido gran objeto de estudio desde hace poco tiempo a partir de observación de interacciones olfatorias entre madres y crías. Debido al efecto tranquilizador que parecían tener en ellas, se les llama también feromonas

apaciguadoras. Son secretadas en el surco intermamario de hembras en periparto, y aunque en condiciones naturales los adultos no están expuestos a ellas, el desarrollo de análogos comerciales ha demostrado que se mantiene la misma respuesta de apaciguamiento en ellos (Pageat, 2010). Dichos análogos no se absorben sistémicamente y no hay toxicidad o efectos secundarios reportados, por lo que su uso es seguro en animales de cualquier edad solos o en combinación con psicofármacos u otras medidas preventivas y de manejo en problemas comportamentales (Landsberg, 2015). Son una herramienta cómoda, práctica y sencilla tanto para los veterinarios como para los propietarios que desean ayudar a las mascotas a hacer frente a situaciones sociales o entornos que puedan generar estrés (Vergara, 2015). Son comercializadas en distintos formatos: difusor, collar y spray.

### 1.5.2. Nutraceuticos

Al estar integrados de tal manera a la sociedad en general y al entorno familiar en específico, la dieta de los animales de compañía es determinada por las tendencias, exigencias y las pautas de consumo de los humanos (Di Cerbo *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, la industria alimentaria específica para perros ha experimentado un crecimiento y una diversificación exponencial, de manera que, desde hace algunos años, se ha enfocado en el uso de ingredientes que satisfagan no solo las necesidades nutricionales básicas para la salud sino también las llamadas "necesidades de comportamiento" (Manteca, 2011) que mejoren las habilidades cognitivas o eviten su deterioro (Deng, 2014). Estos ingredientes forman parte de los alimentos denominados "funcionales".

En un alimento funcional hay un valor nutraceutico que se refiere a aquellos componentes conocidos o no, a los que se atribuyen las funciones de mantenimiento y potenciación de la salud (Luengo, 2007). En el mercado para mascotas se comercializan alimentos con uno o varios nutraceuticos añadidos, pero también se pueden encontrar nutraceuticos en cápsulas o comprimidos. Entre los muchos componentes nutraceuticos existentes (Gruenwald, 2000) los siguientes han sido estudiados en perros:

- Alfa-casozepina (Beata *et al.*, 2007).
- Probióticos (Strompfová, 2017) (McCarville *et al.*, 2016) (Santini, 2017). (Vilson *et al.*, 2018) (Redfern, 2017).
- Antioxidantes. (Buddhachat, 2017), (Norton, 2016), (Buddhachat *et al.*, 2017) (Laflamme, 2012) (Head, 2008).
- Inositol (Case, 2011).
- Triptófano (Di Cerbo, *et al.*, 2017b; Vicinanza, 2013)
- L-Teanina (Di Cerbo, *et al.*, 2017b), (Cicero, 2018), (Araujo *et al.*, 2010)
- GABA Acido gamma-aminobutírico (Argüelles, 2017), (Cicero, 2018)
- Vitaminas del complejo B (Cicero, 2018), (Case *et al.*, 2011)

El uso de estos nutrientes puede ser útil en la salud de los perros (Destefais *et al.*, 2017), (Overall , 2005) ((Sechi *et al.*, 2017) (Manteca, 2011) (Roudebush, 2008) (Di Cerbo, *et al.*, 2017a). Y su manejo ha sido muy bien aceptado por los propietarios (Vicinanza, 2013) (Demontigny-Bédard, 2018) Por ello, la realización de esta tesis pretende colaborar en el estudio de un comprimido comercial (Adaptil express®) con múltiples nutraceuticos (L-triptófano, L-teanina, GABA, vitaminas e inositol) y su efecto ansiolítico en perros que viven dentro de un colectivo.

## **II. OBJETIVO**

El principal objetivo de este trabajo es evaluar si la feromona apaciguadora sintética (Adaptil® spray y el comprimido nutraceutico (Adaptil® express) mejoran el bienestar de perros en un colectivo.

Lo anterior se estimará mediante un indicador fisiológico de estrés crónico (cortisol en pelo) y uno comportamental (etograma).

## **III. HIPÓTESIS**

El uso de Adaptil® spray y Adaptil® comprimidos express reducirá los parámetros fisiológicos y conductuales asociados a estrés crónico en un colectivo de perros.

#### IV. BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN GENERAL

Albuquerque, N., Guo, K., Wilkinson, A., Resende, B., & Mills, D. S. (2018). Mouth-licking by dogs as a response to emotional stimuli. *Behavioural Processes*, 146(June 2017), 42–45. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.11.006>

Amat, M., Camps, T., Le Brech, S., & Tejedor, S. (2016). Manual Práctico de etología clínica en el perr. Gráfica IN-Multimedica S.A.

Araujo, J. A., de Rivera, C., Ethier, J. L., Landsberg, G. M., Denenberg, S., Arnold, S., & Milgram, N. W. (2010). ANXITANE® tablets reduce fear of human beings in a laboratory model of anxiety-related behavior, 5(5), 268–275. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2010.02.003>

Archunan, G., Swamynathan, R., & Karthikeyan, K. (2018). Cattle Pheromones. In *Neurobiology of Chemical Communication* (Vol. 2014, pp. 1–25). Boca Ratón.

Beata, C., Beaumont-Graff, E., Diaz, C., Marion, M., Massal, N., Marlois, N., et al. (2007). Effects of alpha-casozepine (Zylkene) versus selegiline hydrochloride (Selgian, Anipryl) on anxiety disorders in dogs, 2(5), 175–183. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2007.08.001>

Beaver, B. V. (2009a). *Canine Behavior* (2nd ed., pp. 1–319). Missouri: Saunders Elsevier.

Beaver, B. V. (2009b). Canine Ingestive Behavior (pp. 223–243). *Canine Behavior*. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5419-1.00007-9>

Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A., & De Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs, 52(3-4), 307–319. [http://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01131-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01131-8)

Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A., De Vries, H. W., & Mol, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs, 9, 49–62.

Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Applied Animal Behaviour Science*, 66(2), 233–242. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00289-3](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00289-3)

Blackwell, E.-J., Bodnariu, A., Tyson, J., Bradshaw, J. W. S., & Casey, R. A. (2010). Rapid shaping of behaviour associated with high urinary cortisol in domestic dogs, 124(3-4), 113–120. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.02.011>

Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., et al. (2007). *Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare* (Vol. 92).

Boothe, D. M. (2004). Balancing fact and fiction of novel ingredients: Definitions, regulations and evaluation, 34(1), 7–38. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.09.005>

Bradshaw, J. W. S., Pullen, A. J., & Rooney, N. J. (2015). Why do adult dogs “play?” *Behavioural Processes*, 110, 82–87. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.09.023>

- Brennan, P. A., & Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, *444*(7117), 308–315. <http://doi.org/10.1038/nature05404>
- Broom, D. M. (2011). A History of Animal Welfare Science. *Acta Biotheoretica*, *59*(2), 121–137. <http://doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>
- Buddhachat, K., Siengdee, P., Chomdej, S., Soontornvipart, K., & Nganvongpanit, K. (2017). Effects of different omega-3 sources, fish oil, krill oil, and green-lipped mussel against cytokine-mediated canine cartilage degradation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *53*(5), 448–457. <http://doi.org/10.1007/s11626-016-0125-y>
- Burn, C. C. (2017). Bestial boredom : a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation, *130*, 141–151. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.006>
- Cafazzo, S., Maragliano, L., Bonanni, R., Scholl, F., Guarducci, M., Scarcella, R., et al. (2014). Behavioural and physiological indicators of shelter dogs' welfare: Reflections on the no-kill policy on free-ranging dogs in Italy revisited on the basis of 15 years of implementation, *133*, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.046>
- Carenzi, C., & Verga, M. (2009). Animal welfare: review of the scientific concept and definition, *8*(sup1), 21–30. <http://doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.21>
- Case, L., Daristotle, L., Hayek, M., & Foess Raash, M. (2011). Canine and feline nutrition (Tercera Edición, pp. 1–542). Missouri: Mosby Elsevier. Retrieved from <http://b-ok.xyz/book/836623/aac1f8>
- Cobb, M. L., Iskandarani, K., Chinchilli, V. M., & Dreschel, N. A. (2016). A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domestic Animal Endocrinology*, *57*, 31–42. <http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.04.003>
- Dawkins, M. S. (2004). Using behaviour to assess animal welfare, *13*(13), s3–7. <http://doi.org/10.1177/1091581812471490>
- Demontigny-Bédard, I., & Frank, D. (2018). Developing a Plan to Treat Behavior Disorders, *48*(3), 351–365. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.004>
- Deng, P., & Swanson, K. S. (2014). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*, *113*(S1), S6–S17. <http://doi.org/10.1017/S0007114514002943>
- Denham, H. D. C., Bradshaw, J. W. S., & Rooney, N. J. (2014). Repetitive behaviour in kennelled domestic dog: stereotypical or not? *Applied Animal Behaviour Science*, *128*, 288–294. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.007>
- Destefais, S., Giretto, D., Muscolo, M. C., Centenaro, S., Guidetti, G., & Canello, S. (2017). Clinical evaluation of a nutraceutical diet as an adjuvant to pharmacological treatment in dogs affected by epiphora. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0841-2>

- Di Cerbo, A., Morales-Medina, J. C., Palmieri, B., Pezzuto, F., Cocco, R., Flores, G., & Iannitti, T. (2017a). Functional foods in pet nutrition\_ Focus on dogs and cats, *112*(March), 161–166. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.020>
- Di Cerbo, A., Sechi, S., Canello, S., Guidetti, G., Fiore, F., & Cocco, R. (2017b). Behavioral Disturbances: An Innovative Approach to Monitor the Modulatory Effects of a Nutraceutical Diet. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (119), e54878–9. <http://doi.org/10.3791/54878>
- Döring, D., Haberland, B. E., Bauer, A., Dobenecker, B., Hack, R., Schmidt, J., & Erhard, M. H. (2016). Behavioral observations in dogs in 4 research facilities: Do they use their enrichment?, *13*, 55–62. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2016.04.002>
- Duncan, I. J. H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, *24*(2), 483–492.
- Faragó, T., Pongrácz, P., Range, F., Virányi, Z., & Miklósi, Á. (2010). “The bone is mine”: affective and referential aspects of dog growls, *79*(4), 917–925. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.01.005>
- Frank, D., Beauchamp, G., & Palestrini, C. (2010). Systematic review of the use of pheromones for treatment of undesirable behavior in cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *236*(12), 1308–1316. <http://doi.org/10.2460/javma.236.12.1308>
- Gaines, S. A. (2008). Kennelled dog welfare - effects of housing and husbandry.
- Gaultier, E., Bonnafous, L., Bougrat, L., Lafont, C., & Pageat, P. (2005). Comparison of the efficacy of a synthetic dog-appeasing pheromone with clomipramine for the treatment of separation-related disorders in dogs. *Veterinary Record*, *156*(17), 533–538. <http://doi.org/10.1136/vr.156.17.533>
- Gazzano, A., Ogi, A., Torracca, B., Mariti, C., & Casini, L. (2018). Plasma Tryptophan/Large Neutral Amino Acids Ratio in Domestic Dogs Is Affected by a Single Meal with High Carbohydrates Level, *8*(5), 63–68. <http://doi.org/10.3390/ani8050063>
- Glenk, L. M., Kothgassner, O. D., Stetina, B. U., Palme, R., Kepplinger, B., & Baran, H. (2014). Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study, *9*(3), 98–106. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.02.005>
- Gruenwald, J., Brendler, T., & Jaenicke, C. (2000). PDR for Herbal Medicines. (J. Gruenwald, T. Brendler, & C. Haenicke, Eds.) (2nd ed., pp. 1–1106). Montvale, NJ.
- Hall, L. E., Robinson, S., & Buchanan-Smith, H. M. (2015). Refining dosing by oral gavage in the dog: A protocol to harmonise welfare, *72*, 35–46. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.12.007>
- Hall, S. S., Dolling, L., Bristow, K., & Mills, D. S. (2017). Companion Animal Economics (pp. 1–94). UK: CABI.
- Haverbeke, A., Pluijmakers, J., & Diederich, C. (2015). Behavioral evaluations of shelter dogs: Literature review, perspectives, and follow-up within the European member states's legislation with emphasis on the Belgian situation, *10*(1), 5–11. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.07.004>

- Head, E., Rofina, J., & Zicker, S. (2008). Oxidative stress, aging and CNS disease in the canine model of human brain aging, *38*(1), 167–vi.
- Held, S. D. E., & Špinka, M. (2011). Animal play and animal welfare, *81*(5), 891–899. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007>
- Herron, M. E., Kirby-Madden, T. M., & Lord, L. K. (2014). Effects of environmental enrichment on the behavior of shelter dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *244*(6), 687–692. <http://doi.org/10.2460/javma.244.6.687>
- Hetts, S., Derrell Clark, J., Calpin, J. P., Arnold, C. E., & Mateo, J. M. (1992). Influence of housing conditions on beagle behaviour, *34*(1-2), 137–155. [http://doi.org/10.1016/S0168-1591\(05\)80063-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1591(05)80063-2)
- Hubrecht, R. (1993). A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs, *37*(4), 345–361. [http://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90123-7](http://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90123-7)
- Ito, N., Ito, T., Kromminga, A., Bettermann, A., Takigawa, M., Kees, F., et al. (2005). Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(10), 1332–1334. <http://doi.org/10.1096/fj.04-1968fje>
- Kamiski, J., & Marshall-Pescini, S. (2014). The social dog (pp. 1–402). USA: Elsevier.
- Kekan, P. M., Ingole, S. D., Sirsat, S. D., Bharucha, S. V., Kharde, S. D., & Nagvekar, A. S. (2017). The role of pheromones in farm animals - A review, *38*(02), 83–93. <http://doi.org/10.18805/ag.v38i02.7939>
- Kovács, K., Kis, A., Pogány, Á., Koller, D., & Topál, J. (2016). Differential effects of oxytocin on social sensitivity in two distinct breeds of dogs (*Canis familiaris*), *74*, 212–220. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.09.010>
- Kuhne, F., Hößler, J. C., & Struwe, R. (2014). Behavioral and cardiac responses by dogs to physical human–dog contact, *9*(3), 93–97. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.02.006>
- Laflamme, D. P. (2012). Nutritional Care for Aging Cats and Dogs.
- Landsberg, G. M. (2015). Why practitioners should feel comfortable with pheromones. The evidence to support pheromone use, 1–8.
- Lloyd, J. (2017). Minimising Stress for Patients in the Veterinary Hospital: Why It Is Important and What Can Be Done about It. *Veterinary Sciences*, *4*(2), 22–20. <http://doi.org/10.3390/vetsci4020022>
- Luengo, E. (2007). Alimentos funcionales y nutracéuticos (pp. 1–93). Acción Médica.
- Luescher, A. U. (2004). Diagnosis and management of compulsive disorders in dogs and cats, *19*(4), 233–239. <http://doi.org/10.1053/j.ctsap.2004.10.005>
- Manteca, X. (2011). Nutrition and behavior in senior dogs. *Topics in Companion Animal Medicine*, *26*(1), 33–36. <http://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.01.003>

- Mendl, M., Burman, O. H. P., Parker, R. M. A., & Paul, E. S. (2009). Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science*, *118*(3-4), 161–181. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.023>
- Meyer, J., Novak, M., Hamel, A., & Rosenberg, K. (2014). Extraction and Analysis of Cortisol from Human and Monkey Hair, (83), 1–6. <http://doi.org/10.3791/50882>
- Michel, K. E. (2006). Unconventional diets for dogs and cats. *Vet Clin Small Anim*, *36*(6), 1269–81–vi–vii. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.003>
- Mills, D., Karagiannis, C., & Zulch, H. (2014). Stress-its effects on health and behavior: A guide for practitioners. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *44*(3), 525–541. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.01.005>
- Mills, D., Levine, E., Landsberg, G., Horwitz, D., Duxbury, M., Meyer, K., et al. (2005). Current Issues and Research in Veterinary Behavioral Medicine, 1–30.
- Norton, R. D., Lenox, C. E., Manino, P., & Vulgamott, J. C. (2016). Nutritional Considerations for Dogs and Cats with Liver Disease, *52*(1), 1–7. <http://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6292R2>
- Ohl, F., & van der Staay, F. J. (2012). Animal welfare: at the interface between science and society. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *192*(1), 13–19. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.019>
- OMS. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional (pp. 1–78). Ginebra.
- Orlando, J. M. (2018). Behavioral Nutraceuticals and Diets, *48*(3), 473–495. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.012>
- Overall, K. L. (2018). Assessments of confinement - mental and physical - suggest risks hidden in lack of choice, *24*, v–vi. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.03.007>
- Overall, K. L., & Dyer, D. (2005). Enrichment Strategies for Laboratory Animals from the Viewpoint of Clinical Veterinary Behavioral Medicine: Emphasis on Cats and Dogs. *ILAR Journal*, *46*(2), 202–216.
- Owczarczak-Garstecka, S. C., & Burman, O. H. P. (2016). Can Sleep and Resting Behaviours Be Used as Indicators of Welfare in Shelter Dogs (*Canis lupus familiaris*)? *PLoS ONE*, *11*(10), e0163620–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0163620>
- Pageat, P. (2010). Pheromonotherapy in dogs.
- Pageat, P., Lafont, C., Falewée, C., Bonnafous, L., Gaultier, E., & Silliart, B. (2007). An evaluation of serum prolactin in anxious dogs and response to treatment with selegiline or fluoxetine, *105*(4), 342–350. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.11.004>
- Part, C. E., Kiddie, J. L., Hayes, W. A., Mills, D. S., Neville, R. F., Morton, D. B., & Collins, L. M. (2014). Physiological, physical and behavioural changes in dogs (*Canis familiaris*) when kennelled: testing

the validity of stress parameters. *Applied Animal Behaviour Science*, 133, 260–271. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.018>

Péter, P., Éva, S., Anna, K., András, P., & Ádám, M. (2018, October 24). More than noise? - Field investigations of intraspecific acoustic communication in dogs (*Canis familiaris*). <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.003>

Pongrácz, P., Molnár, C., & Miklósi, Á. (2010). Barking in family dogs: an ethological approach. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 183(2), 141–147. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.12.010>

Protopopova, A. (2016). Effects of sheltering on physiology, immune function, behavior, and the welfare of dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 159, 95–103. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.03.020>

Protopopova, A., Hauser, H., Goldman, K. J., & Wynne, C. D. L. (2018). The effects of exercise and calm interactions on in-kennel behavior of shelter dogs. *Behavioural Processes*, 146(November 2017), 54–60. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.11.013>

Rakotoniaina, J. H., Kappeler, P. M., Kaesler, E., Hämäläinen, A. M., Kirschbaum, C., & Kraus, C. (2017). Hair cortisol concentrations correlate negatively with survival in a wild primate population. *BMC Ecology*, 17(1), 30–13. <http://doi.org/10.1186/s12898-017-0140-1>

Rault, J.-L., van den Munkhof, M., & Buisman-Pijlman, F. T. A. (2017). Oxytocin as an Indicator of Psychological and Social Well-Being in Domesticated Animals: A Critical Review. *Frontiers in Psychology*, 8(SEP), 1521. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.01521>

Redfern, A., Suchodolski, J., & Jergens, A. (2017). Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *The Veterinary Record*, 181(14), 370–370. <http://doi.org/10.1136/vr.103826>

Roth, L. S. V., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 19631–7. <http://doi.org/10.1038/srep19631>

Roudebush, P., Schoenherr, W. D., & Delaney, S. J. (2008). Timely Topics in Nutrition for the management of obese and overweight pets, 232(11), 1–10.

Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M. G., & Stefanon, B. (2015). Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context, 10(4), 302–306. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.03.011>

Sandøe, P., Corr, S., & Palmer, C. (2016). *Companion Animal Ethics* (pp. 1–288). Oxford: Wiley.

Santini, A., Tenore, G. C., & Novellino, E. (2017). Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 96, 53–61. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.003>

- Scalia, B., Alberghina, D., & Panzera, M. (2017). Influence of low stress handling during clinical visit on physiological and behavioural indicators in adult dogs: a preliminary study. *Pet Behaviour Science, 0*(4), 20–22. <http://doi.org/10.21071/pbs.v0i4.10131>
- Schneider, L. (2013). Nutraceuticals and their use in veterinary practices. *The New Zealand Veterinary Nurse, 8*–11. Retrieved from <https://www.google.es/>
- Scullion Hall, L. E. M., Robinson, S., Finch, J., & Buchanan-Smith, H. M. (2017). The influence of facility and home pen design on the welfare of the laboratory-housed dog. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 83*, 21–29. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.09.005>
- Sechi, S., Di Cerbo, A., Canello, S., Guidetti, G., Chiavolelli, F., Fiore, F., & Cocco, R. (2017). Effects in dogs with behavioural disorders of a commercial nutraceutical diet on stress and neuroendocrine parameters. *The Veterinary Record, 180*(1), 18–18. <http://doi.org/10.1136/vr.103865>
- Sherman, B. L., & Mills, D. S. (2008). Canine anxieties and phobias: an update on separation anxiety and noise aversions. *Vet Clin Small Anim, 38*(5), 1081–106– vii. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.04.012>
- Sinn, L. (2018). Advances in Behavioral Psychopharmacology. *Vet Clin Small Anim, 48*(3), 457–471. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.011>
- Siracusa, C., Manteca, X., Cuenca, R., Alcalá, M., Alba, A., Lavín, S., & Pastor, J. (2010). Effect of a synthetic appeasing pheromone on behavioral, neuroendocrine, immune, and acute-phase perioperative stress responses in dogs. *Scientific Reports, 237*(6), 637–681.
- Stellato, A. C., Flint, H. E., Widowski, T. M., Serpell, J. A., & Niel, L. (2017). Assessment of fear-related behaviours displayed by companion dogs (*Canis familiaris*) in response to social and non-social stimuli, *188*, 84–90. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.12.007>
- Strompfová, V., Kubašová, I., & Lauková, A. (2017). Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs.
- Surov, A. V., & Maltsev, A. N. (2016). Analysis of chemical communication in mammals: Zoological and ecological aspects. *Biology Bulletin, 43*(9), 1175–1183. <http://doi.org/10.1134/S1062359016110157>
- Taylor, K., & Mills, D. S. (2007). A placebo-controlled study to investigate the effect of Dog Appeasing Pheromone and other environmental and management factors on the reports of disturbance and house soiling during the night in recently adopted puppies (*Canis familiaris*), *105*(4), 358–368. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.11.003>
- Temple, G., & Johnson, C. (2009). *Animals make us Human*. United States of America: Houghton Mifflin Harcourt.
- Touma, C., & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation, *1046*(0), 54–74. <http://doi.org/10.1196/annals.1343.006>

- Travain, T., Colombo, E. S., Heinzl, E., Bellucci, D., Previde, E. P., Prato-Previde, E., & Valsecchi, P. (2015). Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)-A pilot study, *10*(1), 17–23. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.11.003>
- Vergara, T., & Moreira, R. (2015). Revisión : Usos y aplicaciones de feromonas sintéticas en perros (*Canis lupus familiaris*), *7*, 1–5.
- Vicinanza, V. (2013). ¿Puede influir la alimentación en el comportamiento? Últimos resultados y nuevas fronteras de investigación. *Boletín "in De Etolog" la GRETCA*.
- Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., et al. (2018). Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS ONE*, *13*(3), e0193507–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0193507>
- Waran, N., & Randle, H. (2017). What we can measure, we can manage: the importance of using robust welfare indicators in Equitation Science, *190*, 1–29. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.02.016>
- Weiss, E., Miller, K., Mohan-Gibbons, H., & Vela, C. (2012). Why did you choose this pet?: Adopters and pet selection preferences in five animal shelters in the United States. *Animals*, *2*(2), 144–159. <http://doi.org/10.3390/ani2020144>
- Wells, D. L. (2009). Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review, *118*(1-2), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.01.002>
- Wemelsfelder, F., & Mullan, S. (2014). Applying ethological and health indicators to practical animal welfare assessment. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, *33*(1), 111–120. <http://doi.org/10.20506/rst.33.1.2259>
- Wyatt, T. D. (2009). Fifty years of pheromones. *Nature*, *457*(7227), 262–263. <http://doi.org/10.1038/457262a>
- Yeates, J. W., & Main, D. C. J. (2008). Assessment of positive welfare: A review, *175*(3), 293–300. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.009>
- Yin, S., & McCowan, B. (2004). Barking in domestic dogs: context specificity and individual identification, *68*(2), 343–355. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.07.016>

## **CAPITULO I.**

**Efecto de una feromona de apaciguamiento sintética**

**(Adaptil® spray) sobre el bienestar de perros en colectivos.**

## I. RESUMEN

Generalmente los perros que viven en colectivos dentro de refugios, instalaciones de investigación o criaderos se enfrentan a condiciones de vida subóptimas que comprometen su bienestar. Son múltiples los factores que contribuyen para que estos animales experimenten estrés crónico. Las estrategias que se pueden llevar a cabo en dichos sitios para evitar o reducir el impacto de estos factores en la salud física y emocional de sus habitantes, reducir sus niveles de estrés y mejorar en general su calidad de vida. Entre ellos: modificación conductual, administración de psicofármacos, administración de ansiolíticos naturales (como feromonas, nutracéuticos y otros), etc. Una forma de evaluar la necesidad y eficacia de dichas estrategias es mediante indicadores fisiológicos y conductuales. En este estudio se usó un indicador conductual (etograma) y uno fisiológico (determinación de la concentración de cortisol en pelo) para evaluar la eficacia de una feromona apaciguadora canina (Adaptil® spray) usada como estrategia para mejorar su bienestar. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en varias conductas previamente relacionadas con estrés crónico: pacing ( $P<0.0001$ ), standing in rear legs ( $P=0.02$ ), ladridos ( $P=0.014$ ) y vocalizaciones en general ( $P<0.0001$ ). Y un aumento en conductas asociadas a un buen bienestar como interacciones ( $P=0.007$ ) y juego con otro perro ( $P=0.03$ ) o con juguete ( $P<0.0001$ ). También se observó en la concentración de cortisol en pelo una diferencia entre la fase control y la fase con feromona ( $P<0.0068$ ). Los niveles de este glucocorticoide fueron más elevadas durante la aplicación del producto estudiado. Lo anterior sugiere que el uso de Adaptil® spray puede ser una herramienta útil para reducir conductas asociadas a estrés crónico e incrementar aquellas relacionadas a estados emocionales positivos. Su uso es recomendable en combinación con otras estrategias como enriquecimiento ambiental o interacción rutinaria con humanos para que el bienestar de los perros en colectivos se vea realmente favorecido.

## II. INTRODUCCIÓN

Aunque exista una gran variación individual (Protopopova, 2016), los perros que se encuentran en albergues, centros de acogida, instalaciones de investigación o laboratorios con frecuencia viven en condiciones subóptimas (Hubrecht, 1993) (Beerda *et al.*, 1999a) y pueden ver con mayor frecuencia comprometido su bienestar. En estos recintos pueden presentarse factores que evitan o restringen su movilidad, interacción social y capacidad de previsibilidad o control sobre los eventos que ocurren dentro y fuera. Factores que puede provocarles estrés crónico (Cafazzo *et al.*, 2014); (Scullion, 2017).

El estrés crónico causa efectos detrimentales sobre los aspectos físicos (Hennessy, 2013); (Cafazzo *et al.*, 2014)), comportamentales y cognitivos de los animales (Beerda, 1997). La implementación de medidas encaminadas a cuantificar el nivel de estrés (agudo o crónico) por el que atraviesa un organismo han sido una herramienta útil para aminorar o controlar tales efectos negativos. Algunas de las estrategias usadas en perros para este último fin son: enriquecimiento ambiental, modificación conductual, fármacos psicotrópicos y ansiolíticos naturales, entre ellos las feromonas.

Específicamente en caninos, la feromonaterapia es un área prometedora en cuanto a la prevención y manejo de problemas comportamentales relacionados a estrés, ansiedad o miedo de una manera considerada natural y segura (Pageat, 2010); (Siracusa *et al.*, 2010) ya sea usándolas de manera aislada o en combinación con otras herramientas.

### 2.1. ¿Qué son las Feromonas?

Hace más de 50 años (Karlson, 1959), las feromonas se definieron como una “sustancia secretada al exterior por un individuo y recibida por un segundo de la misma especie, en el cual se desencadena una reacción específica, una conducta definitiva o el desarrollo de un proceso” (Wyatt, 2009). Los animales se valen de ellas para actividades como evitación de depredadores, marcaje de territorio, atrayente o estimulante sexual, en la orientación de grupos, para facilitar o estimular el reconocimiento y dependencia padres-crías o como un indicador de la identidad individual (jerarquía, edad, estado de salud), etc. Todas ellas conductas de influencia vital para el éxito reproductivo y mantenimiento de una especie (Brennan, 2006; Roberts *et al.*, 2010; Rodríguez, 2004; Surov, 2016)

### 2.2. Producción y Detección de Feromonas en Mamíferos.

Los carnívoros son considerados como el grupo animal que tiene la más amplia variedad de glándulas secretoras de feromonas. En perros existen seis áreas principales de producción: el área facial, el complejo pedal, el complejo perianal, el complejo genital y el complejo mamario (Pageat,

2010). Los semioquímicos se secretan por glándulas especiales de la lana, el pelo o de la piel o se exteriorizan con la orina, heces, secreciones vaginales y saliva (Archunan, 2018).

La detección de feromonas es compleja. Los vertebrados superiores cuentan con órganos olfativos altamente organizados y complejos constituido principalmente por dos regiones: el epitelio olfatorio principal (MOE) y el órgano vomeronasal (OVN) (Figura 1).

La percepción de los olores en los mamíferos sucede de manera espontánea; ya que durante la respiración, parte del aire inhalado (hasta 30% en algunas especies) es desviado hacia la mucosa olfatoria para percibir los olores. Sin embargo, la captación de las feromonas requiere la

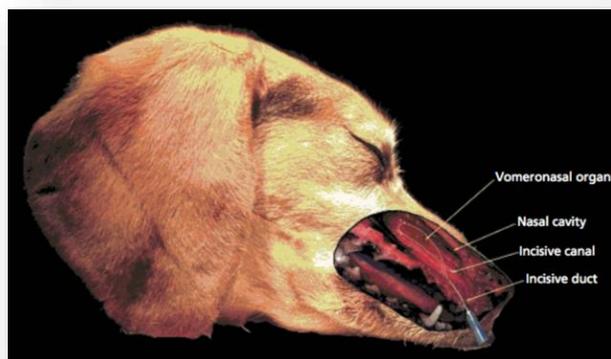


Figura 1. Situación anatómica del OVN en el perro  
(Fuente: Mills, 2005)

estimulación y apertura del OVN (que no es accesible durante la respiración normal) y se lleva a cabo durante la conducta conocida como “flemen” (Liberles, 2014). Durante esta conducta se contrae el músculo elevador labii maxillaris con la boca semiabierta, o en el caso de los perros, con movimientos rápidos de la lengua contra la papila incisiva (conocidos como “tonguing”) (Pageat, 2010).

### 2.3. Tipos de Feromonas.

Una de las formas de clasificar las feromonas es de acuerdo a su naturaleza o función (Wyatt, 2014). De tal manera que hay: feromonas sexuales (Surov, 2016), territoriales (Pageat, 2010), de alarma (Voznessenskaya, 2014) (Fendt, 2006), de congregación (Patel, 2014) (Kekan *et al.*, 2017), maternas/apaciguadoras (Denenberg, 2008; Kim *et al.*, 2010; Mcglone *et al.*, n.d.; Pageat, 2001), etc.

El complejo mamario fue descubierto hace relativamente pocos años. La identificación y el aislamiento de sus feromonas sucedió inicialmente en una cerda y poco después en perras, yeguas, vacas, y ovejas. (Pageat, 2001). Se secretan 3-4 días después del parto por las glándulas sebáceas presentes en el surco las cadenas mamarias y persisten 2 a 5 días después del destete. Su estructura química consiste en tres ácidos grasos: ácido oleico, ácido palmítico y ácido linoleico (comunes en las especies estudiadas), más cuatro específicas en la perra: ácido mirístico, ácido láurico, ácido pentadecanoico y ácido esteárico (Pierotti, 2016).

## 2.4. Feromonas Sintéticas.

La síntesis correcta y precisa de las moléculas de las feromonas puede llegar a ser más compleja y complicada que su identificación (Wyatt, 2009). A pesar de ello, Pageat y colaboradores crearon un análogo estructural que reproduce las propiedades calmantes de las las feromonas apaciguadoras de tres especies de mamíferos domésticos: el cerdo, el caballo y el perro.

Aunque en condiciones naturales los adultos no están expuestos a estas sustancias, el uso de estos análogos sintéticos han reportado efectos en conductas relacionadas a estrés, ansiedad, miedo y agresión (Frank, 2010). En perros se comercializan bajo el nombre de feromona de apaciguamiento canina (DAP, por sus siglas en inglés) y están disponibles en 3 formatos: difusor eléctrico, collar impregnado y spray.

Para determinar la eficacia de su uso, ha sido necesario el uso de indicadores prácticos, objetivos, fiables y replicables. Debido a que en los perros que viven en grupos suelen presentarse comportamientos y cambios inmunológicos u hormonales correlacionados con estrés crónico (Pageat, 2010), esta investigación pretende analizar los efectos que tiene una feromona apaciguadora sintética mediante el uso de un indicador fisiológico y uno comportamental.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Instalaciones

La Granja de investigación está ubicada en la Facultad de Veterinaria (FV) de la Universidad Autónoma de Barcelona (Figura 3). La instalación en la que se encuentran los perros es un edificio de 24 perreras en las que se alojan de manera individual o en pareja 30 perros de raza Beagle. En el centro de las dichas perreras, se ubican dos patios exteriores de 90 m<sup>2</sup> para el ejercicio y recreo de los animales al que acceden una vez por día.

Cada jaula, de 4m<sup>2</sup> está equipada con una plataforma elevada, un bebedero automático y un juguete específico para perros. El piso es de concreto sin material de cama. El material de las paredes es cemento combinado con reja de acero inoxidable que permite la visualización de los perros al exterior y entre congéneres vecinos (Fig. 2)

Las condiciones ambientales de temperatura se mantienen relativamente constantes (22°C) y la ventilación es controlada

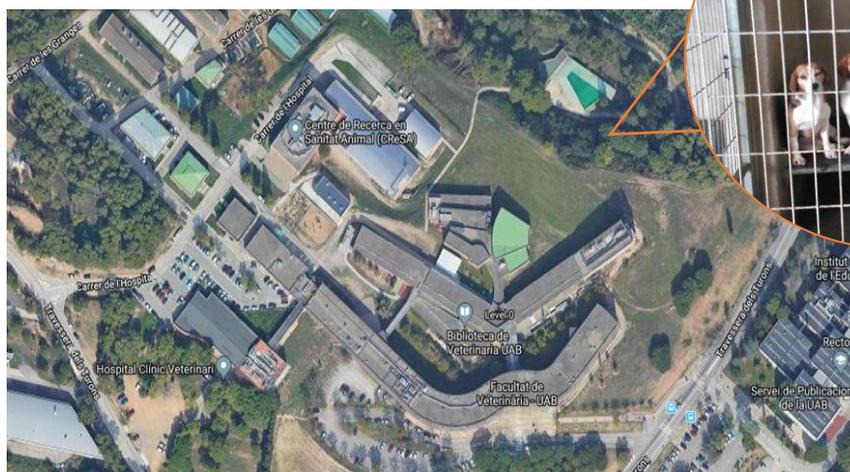


Figura 3. Instalaciones de la Granja de la FV

(Fuente: Google (s.f.))



Figura 2. Canil de los perros  
Imagen de la autora

#### 3.2. Animales.

Para este estudio se trabajó con 8 perros de raza Beagle (4 machos y 4 hembras) pertenecientes a la Granja de la FV de la UAB e identificados con tarjeta de datos en la puerta del recinto y chip intradérmico (Cuadro 1).

Nombre	Sexo	Estado reproductivo	Fecha nacimiento	Fecha de alta	Edad (años)	Peso (kg)
Aleta	h	fértil	2008	11/9/2015	9	11.02
Blanca	h	fértil	11/24/2011	2/8/2013	6	16.06
Crossa	h	fértil	6/26/2011	11/24/2015	6	9.56
Dandy	m	fértil	10/21/2014	11/18/2015	3	18.06
Fosca	h	fèrtil	7/24/2007	4/10/2013	10	9.92
Negritu	m	fértil	5/12/2008	4/10/2013	9	10.18
Pigat	m	fèrtil	4/14/2008	4/10/2013	9	11.20
Pirata	m	fértil	2007	n/d	10	12.96

Cuadro 1. Datos de los perros que participaron en el estudio

### 3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión

Se eligieron animales clínicamente sanos, que al momento del estudio no estuviera bajo tratamiento farmacológico cuya interacción pudiera ser motivo de sesgo (psicofármacos), y que durante el mismo no fueran usados para ningún otro experimento que involucrara estrés y/o dolor. No se tomaron en cuenta edad, sexo o peso como factores de exclusión.

### 3.3. Manejo

No se realizaron cambios en la rutina habitual de los perros. Eran alimentados con pienso una vez al día (9 am) y el agua provista *ad libitum*. La salida al patio de ejercicio se realizaba una vez al día.

### 3.4. Test de Acercamiento

Se realizó con el objetivo de conocer la actitud que los ocho perros del estudio mostraban hacia una persona desconocida y evaluar si dicha actitud difería en presencia y ausencia de Adaptil® spray. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Una persona desconocida caminaba en dirección lineal, de manera suave y lenta, con la mirada en el piso, desde la puerta de entrada de la perrera hasta posarse frente a la puerta del canil.
- Una vez ahí esperaba 3 segundos y giraba su cuerpo (90° a la derecha) hasta quedar de frente hacia la jaula/perro manteniendo la vista en el piso.
- En ese sitio esperaba 3 segundos más y se posaba en la señal “X” marcada en el piso (a un paso de la jaula aproximadamente).
- Al llegar a la “X” miraba hacia el perro y acercaba la mano hasta casi tocar la parte de la jaula que quedaba al nivel de su cintura.

- e) Acto seguido se ponía en cuclillas de manera lateral a la jaula (90° a la derecha) sin mirar al animal y permanecía en dicha posición 5 segundos.
- f) Acto seguido, el voluntario se ponía de pie y se dirigía hacia la puerta de salida, en silencio y de manera tranquila.
- g) El procedimiento se repitió 1 vez por jaula y animal con personas diferentes.

Los resultados del test se expresaron de la siguiente manera:

Valor	Comportamiento ante el desconocido
0	el perro permaneció indiferente al extraño o lo ignoró
1	el perro se mostró amistoso, tranquilo y sociable con el extraño
2	el perro presentó posturas corporales baja, de evasión s o signos asociados a miedo
3	el perro dio indicios de agresividad hacia el extraño.

*Cuadro 2. Valores para el Test de Acercamiento*

### 3.5. Diseño del Experimento

El período de estudio se dividió en dos intervalos de tiempo: Etapa control (T1), correspondiente al intervalo de tiempo entre el día 0 - 28, Etapa o fase de Tratamiento (T2) correspondiente al tiempo entre el día 30 - 45 (Cuadro 3) (Figura 4).

Día	Tratamiento
	T1 o Etapa Control
d0	Test de acercamiento Videograbación de los 8 individuos
d0-d15	Revisión de los videos y registro de las conductas efectuadas por los 8 perros.
d28	Toma de muestra de pelo para la determinación de [CP] en área rasurada el día 0.
	T2 o Etapa Tratamiento
	Videograbación de los 8 individuos
d30 - d45	Revisión de los videos y registro de las conductas efectuadas por los 8 perros. Aplicación de Adaptil spray.
	Toma de muestra de pelo para la determinación de [CP] en área rasurada el día 0
d52	Test de acercamiento

*Cuadro 3 Descripción del modelo experimental*

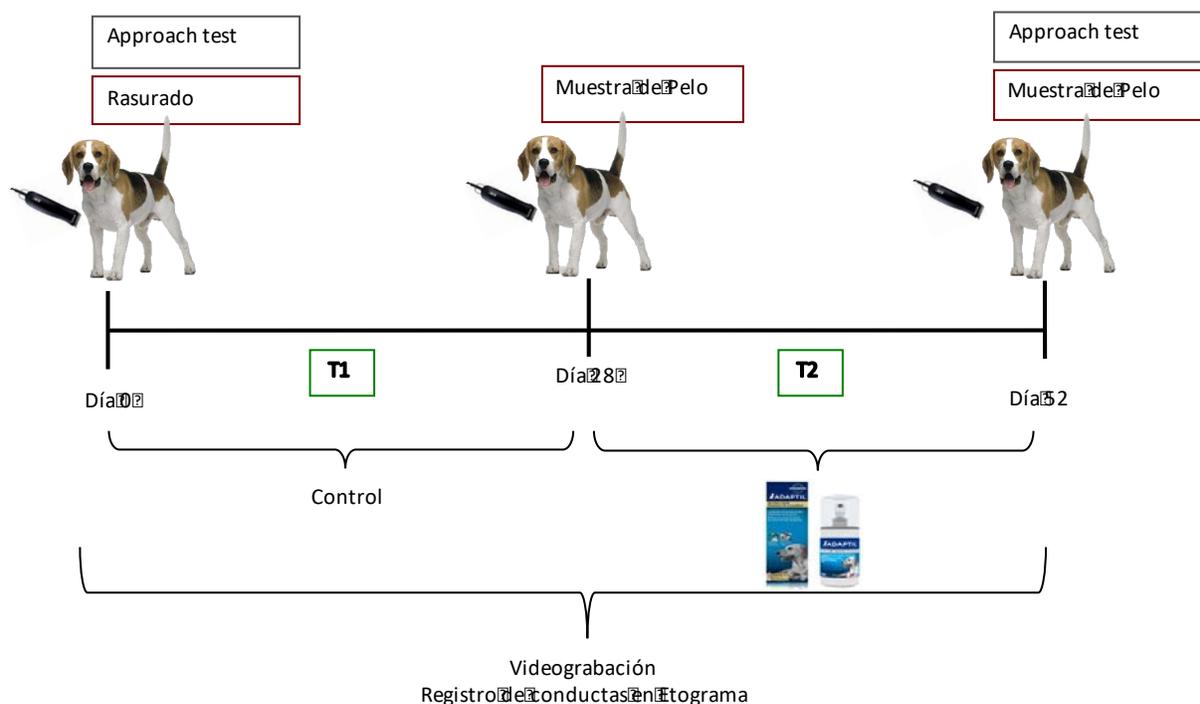


Figura 4. Diseño del Experimento

### 3.6. Observación de Conducta

Las conductas individuales e intraespecíficas realizadas por los 8 animales del estudio fueron observadas en el edificio anexo a las perreras mediante la instalación de un circuito cerrado previamente instalado y registradas con el uso de un etograma (Cuadro 4). Se usó la técnica de muestreo focal y continúa. Los canes fueron observados por un total de 225 minutos distribuidos en tres semanas por tratamiento.

Las conductas fueron agrupadas en siete categorías: Postura, Social, Oral, Repetitivas, Destructivas, Acicalamiento y Vocalizaciones. Cada una de ellas con dos o más subcategorías (Cuadro 5).

SUJETO:

Tratamiento:

# Semana:

Día \_\_\_\_ Mes \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_

TIME	BEHAVIORS																											Other	Remarks	
	Posture							Social					Oral				Repetitive				Destructive			Groom		Vocalization				
	ST	SR	S	L	E	H	LP	T	PD	IT	AG	LL	Y	C	D	PA	CC	B	J	D/S	C	LC	SG	OG	BK	G	CY			
TOTAL																														

Cuadro 4. Etograma

CATEGORÍA	CLAVE	CONDUCTA	DESCRIPCIÓN
POSTURE	ST	Stand	Todas las extremidades en contacto con el suelo
	SR	Stand Rear legs	Extremidades delanteras apoyadas sobre la pared o reja
	S	Sit	Grupa apoyada en el suelo y extremidades anteriores extendidas con los cojinetes apoyados en el suelo
	L	Lay	El perro permanece inactivo, acostado lateral, dorsal o ventralmente, calmado y puede tener o no los ojos cerrados.
	E	Explore	El perro camina de un punto a otro, olfatea e investiga el recinto
	H	Hide	El perro se posiciona debajo de la plataforma ubicada en el recinto, de manera tal que parte del cuerpo o su totalidad permanece oculto a la cámara
	LP	Low Postures	El perro muestra signos y posturas que están relacionadas con el miedo (orejas hacia atrás, cola que cuelga baja o pegada entre las piernas, contacto visual indirecto, etc)
SOCIAL	T	Play with Toy	El perro interactúa con los juguetes proporcionados. Incluye mordiscos, sacudidas o cualquier manipulación.
	PD	Play with Dog	El perro mantiene una interacción lúdica positiva con el compañero de jaula o el perro vecino
	IT	Interaction	El perro mantiene contacto hacia el compañero de la jaula o el vecino. Se toman en cuenta lamidos, miradas sostenidas, y cualquier contacto físico buscado
	AG	Agressive	El perro puede mostrar la cola en posición baja o entre las piernas, el cuerpo rígido, pelos erizados, orejas erguidas, pupilas dilatadas y mirada fija, hocico tenso, nariz arrugada, dientes expuestos con belfos elevados)
ORAL	LL	Lip Licking	El perro pasa la lengua repetidamente sobre su morro. No se toma en cuenta si el perro bebió agua o bostezo antes de realizar la conducta.
	Y	Yawn	Bostezo
	C	Coprofagia	El perro ha sido sorprendido lamiendo o ingiriendo las heces propias o del compañero

	D	Drink	Beber agua o simular hacerlo
REPETITIVE	PA	Pacing	Movimiento continuo de ida y vuelta entre los límites de la jaula o caminar en una ruta fija (generalmente a lo largo de una pared)
	CC	Circling	El perro se mueve en un círculo repetitivo, no variado, alrededor de la jaula
	B	Bounce	El perro salta repetitivamente delante de la valla o la pared manteniendo los miembros posteriores en el suelo
	J	Jump	Salta al aire, ya sea para hacer contacto con un objeto o sin ningún motivo aparente. Las patas traseras deben de haber estado separadas del piso aunque sea por un breve instante
DESTRUCTIVE	DS	Dig/Scratch	El perro araña el suelo o su plataforma con las patas delanteras en un movimiento de excavación de manera repetida. No se toma en cuenta si el animal lo hace previo a echarse
	LC	Lick Cage	El perro mastica la cerca, la cama o la plataforma de manera repetitiva
GROOM	SG	Self Groom	Conductas dirigidas hacia el propio cuerpo del perro; por ejemplo, rascarse o lamerse la piel o el pelo
	OG	Other Groom	El perro mastica o lame la piel o pelo del compañero de jaula o vecino
VOCALIZATION	BK	Bark	Vocalización abrupta cuya frecuencia es captada por los micrófonos
	G	Growl	Vocalización poco estridente, ronca y generalmente de tono bajo
	CY	Cry	Vocalizaciones repetidas, relativamente breves y de tono variable
OTHER	Otras conductas		Conductas no presentes en las anteriores categorías (eliminación, Shaking, paw etc)

Cuadro 5. Descripción de los parámetros comportamentales

### 3.7. Aplicación de la Feromona Sintética

La feromona sintética Adaptil® en la presentación de spray fue aplicada siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta presentación se eligió sobre el collar debido a que los perros de este estudio no están acostumbrados al uso de ningún tipo de collar y podría generarles incomodidad o implicar la posibilidad de ser mordido y/o retirado por algún congénere. El uso del difusor no se planteó como opción debido a la superficie total de las instalación, la ubicación poco apropiada de enchufes en relación a ella, y las posibles corrientes de aire que pudieran haber al abrir puertas o ventanas.

La misma cantidad de aspersiones fue aplicada en cada canilla (8-10 pulverizaciones en cada aplicación). Debido a que el efecto es inmediato y persiste 4-5 horas, la aplicación se repitió cada día del T2 aproximadamente a la misma hora.

### 3.8. Toma de Muestra y Determinación de Concentración de Cortisol en Pelo

La determinación de las [C] es uno de los indicadores más usados para determinar estrés (Stellato, 2017). Una razón de ello es su disponibilidad en un gran número de matrices biológicas, entre ellas: el pelo (Beerda, 1996; Hennessy, 2013). Fuente elegida en este estudio debido a su utilidad en medir estrés crónico.

Antes de iniciar cada uno de los experimentos, se eligió una zona del cuerpo de los perros en la que primara un sólo color, en este caso el blanco. Se optó por el área ventral del cuello (Fig 5), entre las clavículas. Dicha área fue depilada con cortadora de pelo eléctrica al inicio del estudio (d0), tal como sugiere (Davenport, 2006). Se conoce que con el rasurado, y no con el corte, se producen las condiciones óptimas para la incorporación de esteroides mediante la estimulación del crecimiento de pelo nuevo y no se dejan fuera milímetros de pelo, importantes para un conteo correcto de las [C] (Baciu, 2015). En todo momento evitó lesionar la piel o arrancar folículos pilosos. Las muestras recogidas el d28 y d45 fueron del pelo de que volvió a crecer en el mismo parche de piel.

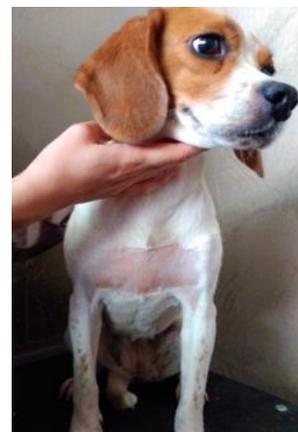


Figura 5. Zona elegida para la muestra de CP

Cada muestra capilar pesaba alrededor de 5 g y se almacenó en sobres de papel marrón en un lugar seco, a temperatura ambiente y sin luz directa hasta su análisis.

La [CP] fue determinada por la técnica ELISA en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la UAB mediante el protocolo descrito por (Tallo-Parra, 2015) (Anexo A).

### **3.8.1. Análisis Estadístico**

Todos las pruebas se realizaron en el programa estadístico “*Statistical Analysis System*” (SAS® 9.2. Institute Inc., Cary, NC). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi cuadrada y se representan como media  $\pm$ SEM, considerando significativo un valor de  $p < 0.05$ .

### 3.9. RESULTADOS

#### 3.9.1. Test de acercamiento

Durante el desarrollo de esta prueba, no hubo diferencias entre los dos tratamientos. Los ocho perros mostraron la misma reacción en la etapa control y en la etapa de administración del nutracéutico. Con excepción de los Beagles 3 y 6 que mostraron temor ante la presencia del extraño, los demás mostraron interés por el mismo (Cuadro 6).

Clave y nombre de Perro	T1	T2
(B1) Negritu	1	1
(B2) Pigat	1	1
(B3) Pirata	2	2
(B4) Dandy	1	1
(B5) Fosca	1	1
(B6) Blanca	2	2
(B7) Crossa	1	1
(B8) Aleta	1	1

Cuadro 6. Reacción de los perros ante la presencia de un desconocido

#### 3.9.2. Efectos en la conducta

No se apreciaron diferencias significativas en las categorías referentes a conductas orales ( $P=0.12$ ), destructivas ( $P=0.64$ ) o de acicalamiento ( $P=0.06$ ) entre tratamientos. Algunos comportamientos (posturas asociadas a miedo, gruñidos y destrucción o mordedura de jaula) se presentaron en niveles de frecuencia y variación muy bajos (ocurrencia promedio <1) para que los análisis estadísticos fuera lo suficientemente robustos a niveles tan bajos.

La exposición a AS causó un efecto significativo en las categorías Postura, Social, Repetitivas y Vocalizaciones. Específicamente, hubo una disminución en las medias en postura de parado sobre las patas traseras o *standing rear* ( $P<0.02$ ),  *pacing* ( $P<0.0001$ ), ladridos ( $P<0.014$ ) y vocalizaciones en general ( $P<0.0001$ ). A la vez, se incrementaron la interacción entre individuos ( $P<0.007$ ) y conductas de juego con perro ( $P=0.03$ ) o juguete ( $P<0.0001$ ) (Cuadro 7) (Figuras 6 y 7).

Conducta	P-valor	Media control	SD	Media spray	SD
post_st	0.57	3.2	2.927	2.983	2.547
post_sr	<b>0.02 *</b>	2.617	4.983	1.742	3.35
post_s	1	1.85	2.187	1.850	2.028
post_l	0.51	3.058	1.190	3.167	1.225

post_e	0.14	2.925	4.429	2.408	2.803
post_h	0.59	0.183	0.565	0.242	0.756
post_lp	nvs	0.025	0.157	0	0
posture	0.24	13.858	11.705	12.392	8.2247
soc_pt	<b>&lt;0.0001*</b>	0.05	0.254	0.175	0.723
soc_pd	<b>0.03*</b>	0.15	0.682	0.25	1.132
soc_it	<b>0.007*</b>	1.267	1.684	1.925	3.256
soc_ag	0.33	0.0167	0.129	0.008	0.091
social	0.8	2.542	9.308	2.358	4.260
oral_ll	0.49	0.408	0.845	0.508	1.053
oral_y	0.24	0.283	0.735	0.192	0.507
oral_c	1	0.017	0.183	0.017	0.129
oral_d	0.21	0.308	0.591	0.225	0.476
oral	0.12	1.417	3.564	0.942	1.386
rep_pa	<b>&lt;0.0001*</b>	0.192	0.802	0.025	0.157
rep_cc	0.87	0.325	1.055	0.359	1.044
rep_b	0.63	0.367	1.289	0.4	1.682
rep_j	0.92	0.508	1.918	0.475	3.241
repetitive	0.81	1.392	3.816	1.258	4.697
des_ds	0.16	0.108	0.362	0.208	0.755
des_cw	nvs	0.008	0.091	0	0
des_lc	0.54	0.117	0.414	0.075	0.370
destructive	0.64	0.383	1.427	0.283	0.862
groom_sg	0.48	0.8	1.066	1.133	1.419
groom_og	0.43	0.167	0.726	0.067	0.645
groom	0.06	1.467	4.044	1.2	1.678
voc_bk	<b>0.014*</b>	1.092	2.517	0.45	1.122
voc_g	nvs	0.117	0.624	0	0
voc_cy	0.25	0.125	0.495	0.058	0.416
vocalization	<b>&lt;0.0001*</b>	1.809	4.736	0.508	1.174

Cuadro 7. Resultados de la observación comportamental

(Para descripción de las categorías referirse al etograma en la página No. \_) nvs: no hay valores suficientes. Los efectos significativos se encuentran resaltados en negritas

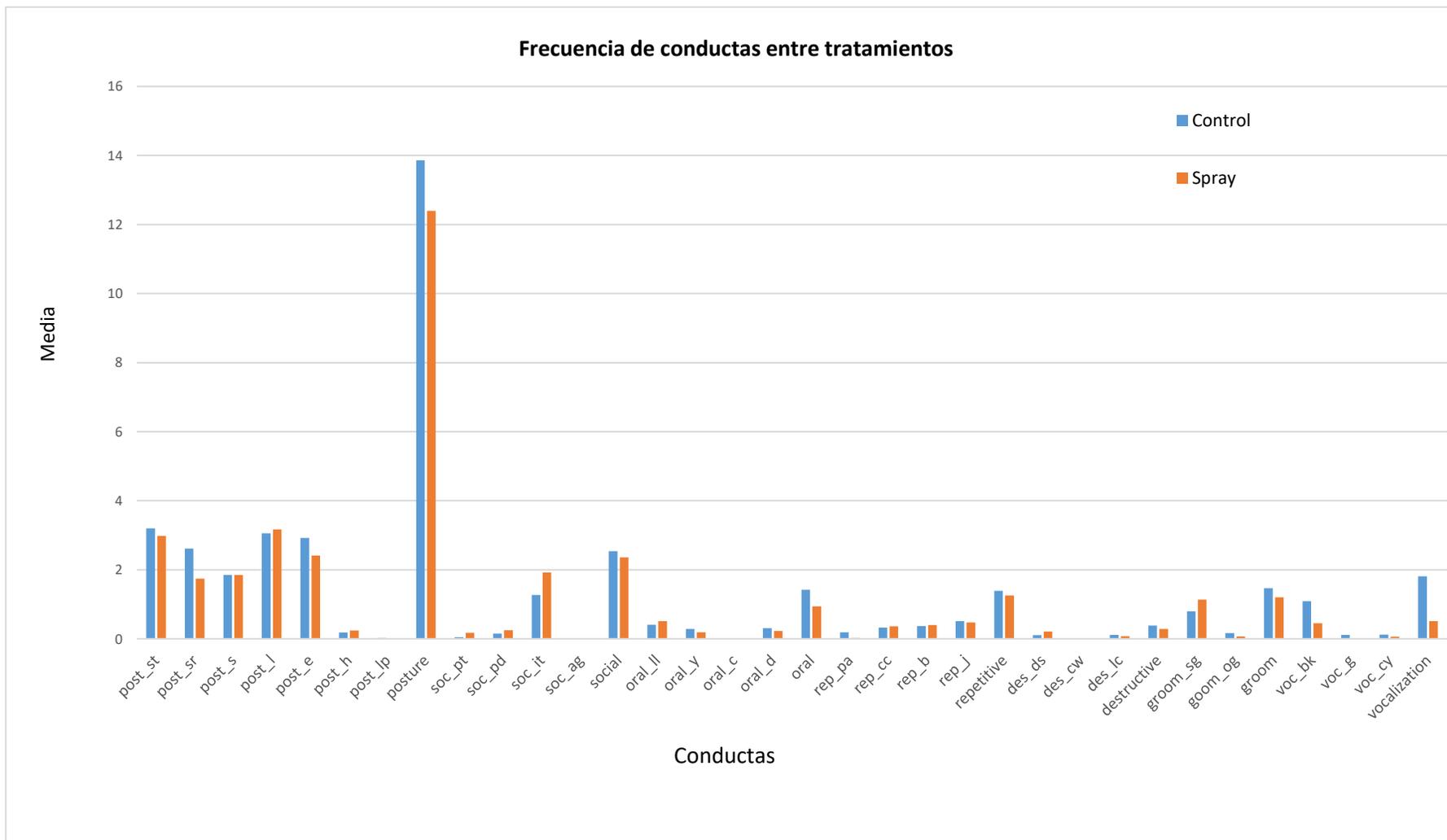


Figura 6. Frecuencia de conductas durante ambos tratamientos

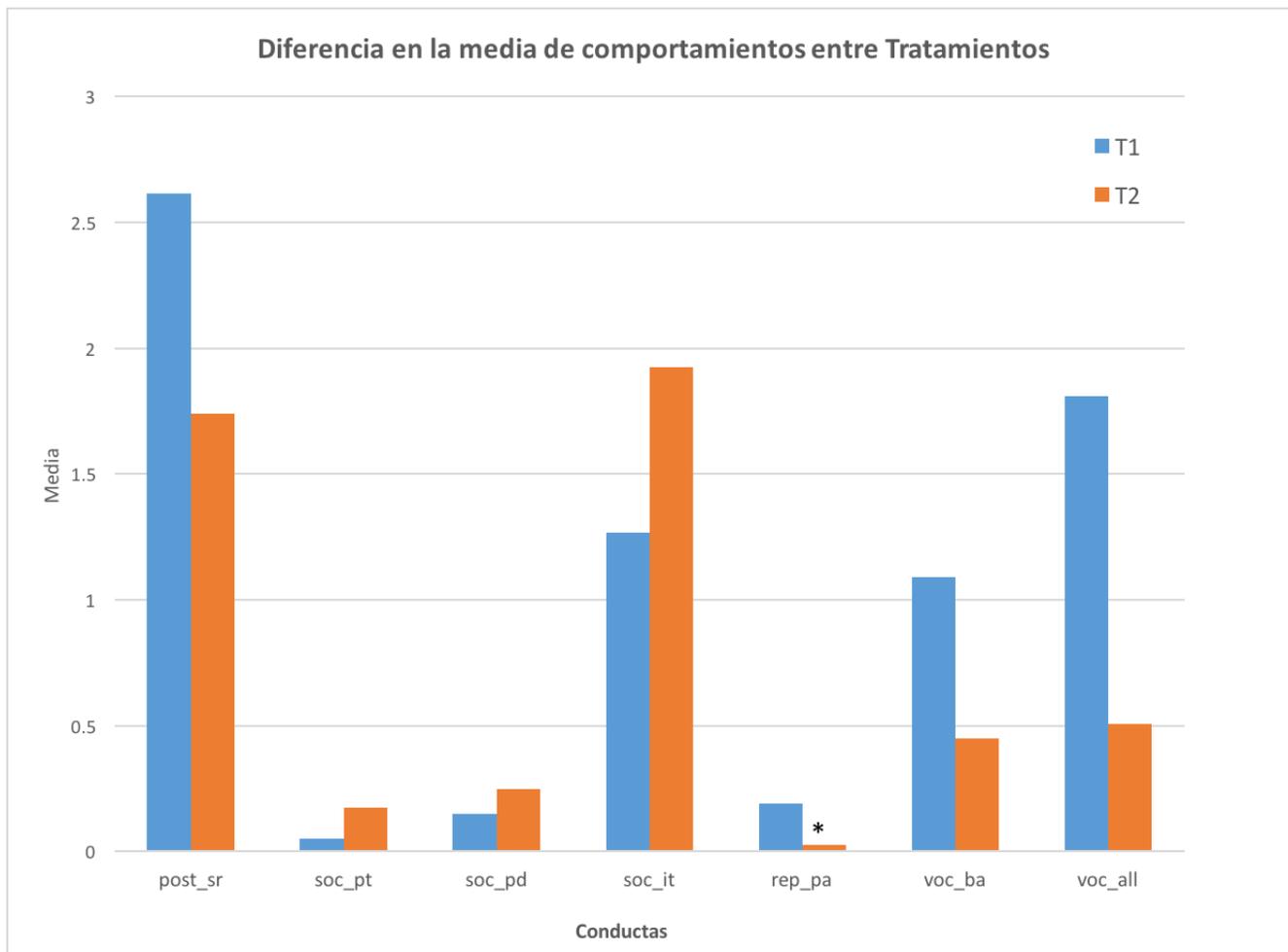


Figura 7. Conductas con diferencia significativa entre tratamientos

### 3.9.3. Determinación de la concentración de Cortisol en Pelo

Los niveles de C tomadas del pelo muestreado el d28 (T1) y d45 (T2) del estudio e se muestran en el Cuadro 8, junto con la media, mínima, máxima, error estándar y desviación estándar para todos los perros (pg de cortisol/mg de pelo). La [CP] en este estudio fue diferente entre tratamientos ( $P < 0.0068$ ) Siendo mayor en la etapa con feromona (Figura 8).

Tratamiento	Pr>F	Media [Cp]	Mín	Máx	SD	SE
T1 Control	0.0068*	6.195	5.353	7.137	0.614	0.217
T2 AS		8.088	6.160	11.245	1.684	0.595

Cuadro 8. Concentración de cortisol en pelo con y sin Adaptil spray

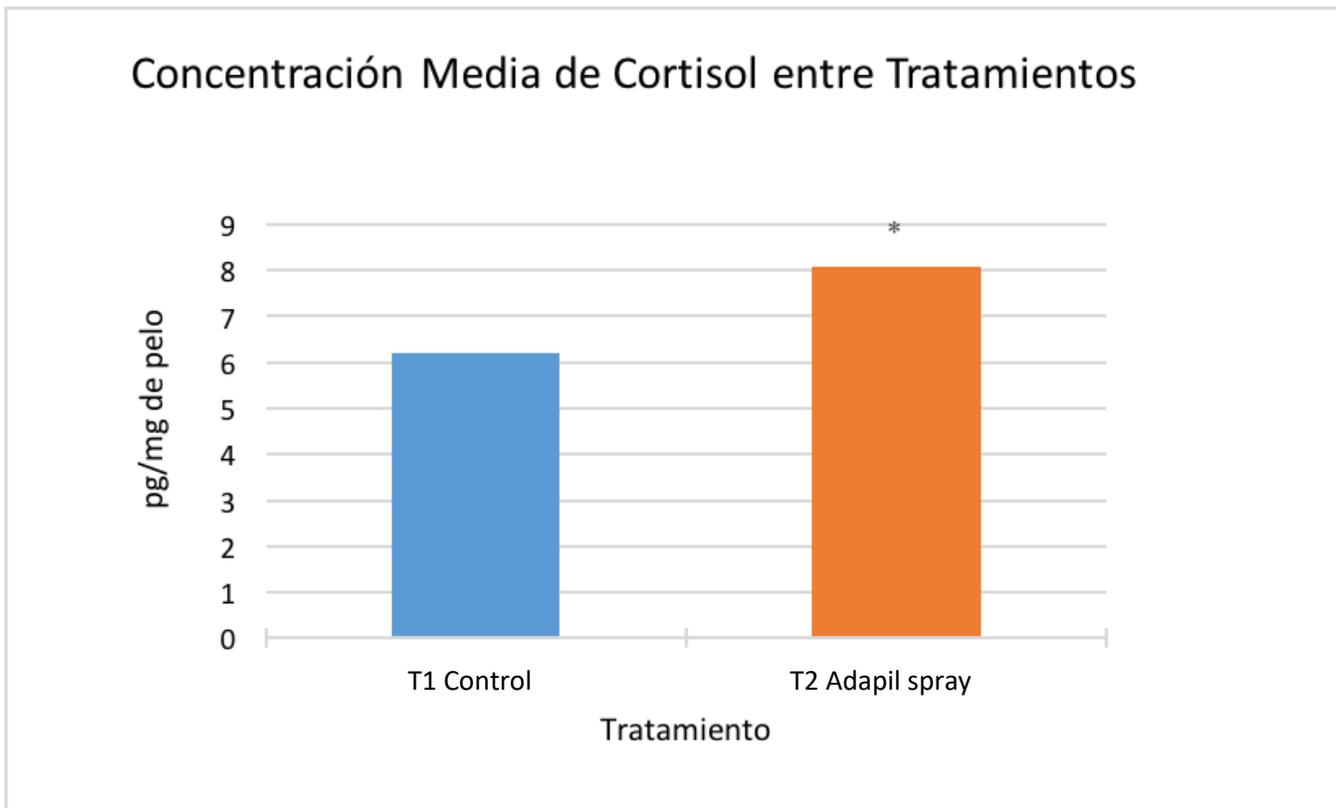


Figura 8. Concentración de cortisol en Pelo con y sin Feromona

## IV. DISCUSION

Existen cerca de 20 estudios publicados usando la feromona sintética Adaptil. Sin embargo, al conocimiento de la autora, no hay alguno a la fecha que haya evaluado AS mediante un indicador comportamental y la concentración de CP de perros en un colectivo.

### 4.1. Diseño

La mayoría de los estudios realizados con DAP han reportado el uso de su presentación en difusor (Levine, 2008), (Tod, 2005), (Mills, 2006), (Mills *et al.*, 2006), (Osella, 2015), (Soares, 2012), (K. Taylor, 2007) (Gaultier, 2005), (Sheppard, 2003), (Kim *et al.*, 2010) o collar (Gandia, 2006), (Broach, 2016), (Sherman, 2008), (Landsberg *et al.*, 2015), (Grigg, 2015), (Gaultier, 2009), (Dehasse, 2005, Gaultier *et al.*, 2008) y (Ley, 2010), y sólo dos de ellos el spray (Hermiston, 2018), (Siracusa *et al.*, 2010) .

Para la realización de esta tesis, elegimos AS debido a su practicidad y aplicación: es portátil, se puede aplicar sobre cualquier superficie (ropa del cuidador, área de descanso, zona segura, jaula) y su efecto es casi inmediato. El collar no se eligió para este estudio debido a la posibilidad de ser mordido e incluso ingerido por el mismo u otro perro del colectivo. Además, hay factores que pueden alterar su efecto (baños, temperatura, suciedad), la relación costo/numero de perros es más alta y el efecto podría tomar más tiempo en ser observado. Aunque el difusor permite una aplicación continua y duradera sobre un área más grande, su uso no es posible en áreas en las que no hay enchufes, o impráctica cuando su ubicación no es la ideal (como en nuestro caso), o cuando no existe electricidad. Además Beaver, (2009) documenta que en domicilios donde se ha usado, los particulares reportan que sus perros prefieren descansar en proximidad del difusor, otros son neutrales a su presencia y unos últimos se agitan aparentemente por el producto.

Para determinar exclusivamente el efecto del análogo de la feromona apaciguadora, en nuestro estudio no se uso ninguna otra intervención o cambio en el manejo rutinario que pudieran sesgar su evaluación. Otros estudios, han usado a la vez técnicas de EA (Sherman, 2008), desensibilización y contra-condicionamiento (Levine, 2008) y otras técnicas de modificación de comportamiento (Gaultier *et al.*, 2005) por lo que los resultados no pueden ser exclusivamente atribuidos al Adaptil. De la misma forma que Hermiston *et al.*, (2018) y contrario a lo concebido por Mills *et al.*, (2006), Taylor (2007) y Denenberg (2008) no usamos tratamiento placebo en la fase control y el investigador conocía el tratamiento en cada momento. Lo primero pudo tener repercusión en las concentraciones de CP, como se explicará en el segmento correspondiente.

En contraste a otros estudios (Levine, 2008), (Demontigny-Bédard, 2018), (Rooney, 2009) los perros del nuestro pertenecen a una institución educativa y no a particulares, lo cual evitó desertaciones. Algunos estudios han contado con la participación de los propietarios para determinar el efecto de la DAP (Gaultier *et al.*, 2005), (Gandia, 2006), (K. Taylor, 2007), (Haverbeke, 2015), (Levine, 2008) o Ley (2010). Esta

colaboración puede tener la ventaja de que estos puedan reconocer conductas “anormales” en la mascota, ya que conocen su comportamiento rutinario. Pero, su percepción es diferente a la de un profesional (Mills *et al.*, 2006) o pueden inducir involuntariamente un sesgo por inconsistencias en el manejo y el uso de refuerzo positivo o punitivo sobre conductas del animal (Beerda *et al.*, 1997). Incluso las expectativas que tengan sobre el tratamiento pueden llegar a afectar los resultados (Dehasse, 2005). Para esta tesis la aplicación del etograma, la aplicación diaria de AS y el muestreo de pelo fueron realizadas solamente por la investigadora y esporádicamente con el apoyo de otra mujer, debido a que los perros son capaces de discriminar el género y moldear el comportamiento en consecuencia (Stellato *et al.*, 2017). Debido a la importancia que el contacto con humanos puede tener para los canes (Mendl, 2009) y que la sola presencia de una persona puede afectar su fisiología (Dawkins, 2004) la interacción con ellos fue la mínima necesaria durante el estudio.

En este mismo tenor, autores han realizado el registro de las conductas de manera presencial (Held, 2011) y en el momento que son realizadas. Gracias a una prueba piloto en las instalaciones de nuestro estudio, fue posible observar que la presencia del investigador provocaba o inhibía comportamientos en los sujetos experimentales. Esto sucedió con independencia del tiempo de su permanencia en el recinto o de una barrera visual. Por esto, para el diseño de esta investigación (tal como lo hicieron Mills *et al.*, (en 2006), se instaló un circuito cerrado para videograbar y analizar detalladamente el comportamiento de los Beagles. En ocasiones hubo conductas repetitivas (por ejemplo, saltos o cambios de postura) que ocurrieron de una manera tan consecutiva y rápida que sin las videograbaciones hubieran sido imposibles de cuantificar.

Los análogos comerciales de la DAP han sido estudiados en animales de todas las edades y en varios entornos. Por ejemplo centros de entrenamiento (Dehasse, 2005), instalaciones veterinarias (Siracusa *et al.*, 2010) (Mills *et al.*, 2005) , en refugios o colectivos (Tod *et al.*, 2005) (Osella *et al.*, 2015) estéticas (Soares *et al.*, 2012) hogares (Taylor, 2007) durante transporte (Denenberg, 2008), y sólo uno de ellos con perros viviendo en un colectivo de docencia universitario (Grigg, 2015).

#### **4.2. Test de acercamiento**

Ante la exposición de AS, los perros de este estudio no presentaron diferencias de comportamiento ante la presencia y acercamiento de un desconocido. Al ser instalaciones de investigación universitaria, esto pudo deberse a que los perros están habituados a ver distintas personas con una frecuencia considerable. Con perros de albergue y usando el mismo producto Hermiston *et al.*, (2018) tampoco observaron diferencias conductuales significativas ante la presencia de un perro desconocido paseado por investigado. Y, aunque Tod *et al.*, (2005) tampoco encontraron este efecto en perros ante persona desconocida, sí observó que la frecuencia de ladridos disminuyó ante un desconocido “amable”. Gaultier *et al.*, (2005) observaron diferencias significativas entre perros usando Adaptil collar y su grupo control ante personas desconocidas a partir del día 15 de uso.

### 4.3. Observación de la Conducta

Las condiciones de vivienda deficientes, el ruido, el espacio reducido, la restricción social, la incapacidad de controlar el ambiente y las situaciones son algunos de los factores que ocasionan estrés crónico y ansiedad en los perros viviendo en colectivos (Yeates, 2008) (Owczarczak-Garstecka, 2016).

Las conductas asociadas a estos estados, han tratado de ser registradas en varios de los estudios mencionados usando en análogo de la feromona apaciguadora. El rango de tiempo durante el cual los perros han sido observados para registrar su comportamiento varía enormemente entre estudios (desde 10 segundos (Hermiston *et al.*, 2018) hasta 1 año (Levine, 2008)). Por lo que en los resultados probablemente se reflejen estas diferencias metodológicas.

Los Beagles en nuestro estudio pasaban gran cantidad del tiempo de observación recostados o durmiendo, pero no hubo diferencia en su frecuencia entre tratamientos. (Dehasse, 2005) observó una mejora en la calidad del sueño nocturno usando DAP collar, sin embargo, aunque esta conducta fue observada algunos días por la investigadora, no fue considerada para su evaluación.

Durante los periodos de grabación, la conducta más repetida por los perros fue el cambio de postura. Con excepción de una disminución significativa en la postura de “standing rear” no se observó efecto entre tratamientos en el resto de la categoría. Algunos autores han manifestado que los perros estresados (Scalia, 2017; Travain *et al.*, 2015) alojados en jaulas austeras (Kovács, 2016; Rault, 2017) o en aislamiento social (Cafazzo *et al.*, 2014) (Wells, 1992) presentan más actividades motoras (Boissy *et al.*, 2007). Sin embargo Part *et al.*, (2014), Gaines (2008) y Siracusa *et al.*, (2010) observaron este aumento de actividad en perros alojados grupalmente con independencia del tamaño de la jaula, Sandri (2015) no encontró diferencias entre perros agrupados o aislados y Rooney *et al.*, (2009) reportaron mayor tiempo de inactividad en perros bajo estrés crónico. Esta disparidad, hace comprender, que la actividad en los perros que viven en colectivos depende de varios factores, por lo que el uso de DAP por sí sólo puede no ser suficiente para modificarla.

En cuanto a las posturas asociadas a miedo, coincidiendo con el estudio de Tod *et al.*, (2005) que usaron DAP difusor, la presente investigación tampoco obtuvo diferencias entre tratamientos a pesar de que dos de los ocho Beagles mostraron una conducta temerosa ante los desconocidos según el test de aproximación realizado.

Adaptil spray parece tener un efecto significativo en la frecuencia de juego, e interacciones afiliativas. En nuestro trabajo se obtuvo una media significativamente más elevada de interacción entre perros, conductas de juego y juego con juguetes. Esto incluso de que no haberse realizado variación del objeto y no ser los reportados como más interesantes para los perros (fácilmente masticable y/o con ruido (Wyatt, 2009). Este resultado es alentador, ya que el juego y las interacciones positivas se asocian a un buen bienestar (Broom, 2011), y por tanto, su ausencia un indicador de su deterioro. (Denenberg, 2008),

también reportó más frecuencia de interacciones, intención de juego y socialización general en cachorros con collar DAP versus placebo.

(Denham, 2014) reportó “bounce” o rebote como el comportamiento repetitivo más común en los perros de su estudio. En el nuestro la más frecuente fue “jump” pero no se observó diferencia en su presentación entre la T1 y T2. Tampoco las hubo con “circling” ni “bounce” pero sí con “pacing”. Esta conducta repetitiva también redujo en el estudio de (Kim *et al.*, 2010) pero en cachorros usando collar DAP.

La diferencia significativa estudio en la media de vocalizaciones que se observó con el uso de AS en nuestro son relevantes. Es conocido que en instalaciones en las que puede haber decenas de perros el ruido continuo por vocalizaciones persistentes puede ser un factor estresante y dañino, tanto para ellos como para el personal que las frecuente. El nivel de ruido que se presentan en el ambiente de las perreras puede llegar a superar los 100-125dB. Además, la aleatoriedad de los ladridos, su incidencia sincronizada y la incapacidad de las personas para controlarlas hacen que se perciban como un problema irritante. A pesar de que la frecuencia de vocalizaciones esta sujeta al contexto (Péter, 2018), a variables individuales o ambientales (Protopopova, 2016) y a la genética (Di Cerbo *et al.*, 2017). En perros de albergue está correlacionada con falta de estimulación mental (Beaver, 2009), búsqueda de atención, hiperactividad, ansiedad y estrés crónico la (Herron, 2014). Por ello es importante su cuantificación (Temple, 2009), evaluación (Brennan, 2006; Faragó, 2010; Kekán *et al.*, 2017; Surov, 2016) (Wyatt, 2009) y disminución (Herron *et al.*, 2014) dentro de colectivos.

Los resultados en cuanto a la disminución de vocalizaciones coinciden con los obtenidos en diferentes estudios. Hermiston *et al.*, (2018) reportaron una disminución en la intensidad media de los ladridos (control 63 dB versus DAP 57dB); Tod *et al.*, (2005) una reducción en su amplitud y frecuencia. Stellato *et al.*, (2017) menos vocalizaciones en cachorros recientemente adoptados; Dehasse (2005) menos vocalización nocturna tanto en perros con DAP como en placebo y Gaultier, en dos estudios, concluyó que los perros usando DAP mostraron menos vocalización en relación con los perros control (Gaultier *et al.*, 2008; 2009) y que el porcentaje de disminución de vocalizaciones (77%) fue muy parecido al obtenido con clomipramina (89%) (Gaultier *et al.*, 2005).

En nuestro estudio se observó que los ladridos estaban altamente motivados por la presencia de personal y su presencia era un predictor de excitación, lo cual suele suceder en perros crónicamente restringidos de contacto social (Herron *et al.*, 2014).

Conductas que se observaron en este estudio y no estaban integradas en el etograma fueron: “paw” o suspensión de pata delantera, morder repetitivamente los miembros u otras partes del cuerpo, “shaking” o sacudir el cuerpo y persecución de cola. Han sido anteriormente reportadas en perros con restricción social o en confinamiento por Protopopova (2016), Broom, (2011), y Pastore (2011) respectivamente, pero se presentaron con una frecuencia esporádica.

#### 4.4. Determinación de la Concentración de Cortisol en Pelo

La determinación de cortisol en pelo, es una técnica menos invasiva, que no requiere mucha capacitación (Russell, 2012), con menos variación intraindividual (Bryan, 2013) y sin efectos significativos de edad, raza, sexo ni estado reproductivo (Bennett, 2010). El pelo integra el cortisol durante el crecimiento, representando el estrés de las semanas o meses anteriores. El cortisol salival, urinario y fecal sólo de los minutos u horas anteriores. Monitorear el estrés crónico con estas dos últimas matrices, supondría recolectar una gran número de muestras. (Bryan *et al.*, 2013; Roth, 2016; Sheriff, 2011; Siniscalchi, 2013) sin mencionar las complicaciones técnicas. El promedio de cortisol basal para todos los perros fue de 6.195 pg/mg en la T1 y 8.086 en la T2. Fueron resultados similares a los informados en otros estudios que utilizaron métodos similares:  $11.6 \pm 0.8$  pg / mg en Bryan *et al.*, (2013) ,  $10.9 \pm 0.6$  pg / mg en Bennett (2010) y  $9.8 \pm 11.4$  pg / mg en (Piva *et al.* 2008). Con excepción de (Grigg, 2017), quienes para tomar el cortisol base tomaron todo el pelo y no sólo el segmento que creció durante la fase experimental y obtuvieron cantidades muy superiores.

Los resultados de la [CP] obtenidas entre tratamientos en esta investigación ejemplifican una vez más que el cortisol es una hormona compleja cuya presencia y concentración con frecuencia no es fácil de interpretar. Aunque el refugio es indudablemente un entorno restrictivo con altos niveles de ruido y pocas oportunidades para la interacción social (Beerda, 1999b), la correlación entre el cortisol y el tiempo que un perro permanece en él no parecen ser consistentes (Mills, 2014) y se presentan diferencias individuales. Hay un aumento en las [C] justo después de la admisión a las instalaciones, pero disminuye a lo largo del tiempo (Meyer, 2012). Este cambio puede ser causado por la desregulación del eje HPA y ser indicativo de estrés crónico (Scullion *et al.*, 2017) o a que haya un aumento inicial de cortisol debido al estrés agudo al entrar en una perrera seguido de habituación y disminución a los niveles basales. Esto ocurre cuando ya no se es capaz de enfrentar el estresor crónico (Cobb, 2016), lo cual podría ser una razón de que la terapia del DAP por sí sola no marcara un efecto más determinante en los sujetos de estudio. Los perros de nuestro estudio habían permanecido en las instalaciones por años, por lo cual es probable que estuvieran habituados a ellas. Los niveles de cortisol pueden aumentar también en respuesta a estímulos positivos (Cobb *et al.*, 2016) como el coito, el juego y en respuesta a las interacciones entre humanos y perros (Roth *et al.*, 2016). Y como resultado de experiencias previas con el entorno y personas, los perros pueden mostrar conductas de anticipación, que pueden disminuir los niveles de cortisol (Glenk *et al.*, 2014). Durante nuestro estudio, a pesar de que el contacto con el investigador fue mínimo, los animales recibían una “atención” que normalmente no tenían, aproximadamente a la misma hora durante el T2. Lo cual pudo haber afectado las concentraciones de CP.

Existen diferencias individuales de crecimiento capilar relacionadas con el temperamento del perro (Gunaratnam, 1983) que fueron observadas en el estudio, lo cual fue la única complicación técnica que se tuvo para utilizar esta matriz, aunque no estuvo relacionada con el temperamento de los individuos, sino más probablemente a conductas de postura u otras no conocidas.

## V. CONCLUSIONES

El uso de Adaptil spray en este estudio disminuyó conductas asociadas a estrés en los perros estudiados. Estas fueron “ *pacing* ”, “ *standing in rear legs* ”, ladridos y vocalizaciones en general. De igual modo aumentaron dos comportamientos asociados a un buen bienestar: interacción afiliativa entre perros y juego con perro y con juguete.

Al usar como indicador fisiológico el cortisol en pelo, se obtuvo una concentración significativamente mayor con el uso de Adaptil® spray. Efecto posiblemente derivado de la interacción del persona con los perros durante la aplicación del producto y que puede haberse convertido en un estímulo condicionado causante de excitación.

Esto sugiere que, a pesar de que la observación conductual puede dar lugar a inferencias sobre el bienestar de un colectivo canino, se deben considerar los estilos de afrontamiento individuales el contexto para evaluarlo.

Por lo tanto, el uso de Adaptil® spray puede ser una estrategia útil para reducir conductas asociadas a estrés crónico e incrementar aquellas relacionadas a estados emocionales positivos. Sin embargo es recomendable su combinación con otras estrategias como enriquecimiento ambiental o interacción rutinaria con humanos para que el bienestar de los perros en colectivos se vea realmente favorecido.

## VI. BIBLIOGRAFÍA CAPITULO 1

Archunan, G., Swamynathan, R., & Karthikeyan, K. (2018). Cattle Pheromones. In *Neurobiology of Chemical Communication* (Vol. 2014, pp. 1–25). Boca Ratón.

Baciu, T., Borrull, F., Aguilar, C., & Calull, M. (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, *856*, 1–26. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.051>

Beaver, B. V. (2009). *Canine Behavior* (2nd ed., pp. 1–319). Missouri: Saunders Elsevier.

Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A., & De Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs, *52*(3-4), 307–319. [http://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01131-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01131-8)

Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A., De Vries, H. W., & Mol, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs, *9*, 49–62.

Beerda, B., Schilder, M. B., Bernadina, W., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999a). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Applied Animal Behaviour Science*, *66*(2), 243–254. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00290-X](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00290-X)

Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, *30*(3), 272–279. <http://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0033>

Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999b). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Applied Animal Behaviour Science*, *66*(2), 233–242. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00289-3](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00289-3)

Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences, *39*(3), 171–180. <http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.003>

Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., et al. (2007). *Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare* (Vol. 92).

Brennan, P. A., & Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, *444*(7117), 308–315. <http://doi.org/10.1038/nature05404>

Broach, D., & Dunham, A. E. (2016). Evaluation of a pheromone collar on canine behaviors during transition from foster homes to a training kennel in juvenile Military Working Dogs, *14*, 41–51. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2016.05.001>

Broom, D. M. (2011). A History of Animal Welfare Science. *Acta Biotheoretica*, *59*(2), 121–137. <http://doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>

- Bryan, H. M., Adams, A. G., Wynne-Edwards, K. E., & Smiths, J. (2013). Hair as a Meaningful Measure of Baseline Cortisol Levels over Time in Dogs, *52*(2), 189–196.
- Cafazzo, S., Maragliano, L., Bonanni, R., Scholl, F., Guarducci, M., Scarcella, R., et al. (2014). Behavioural and physiological indicators of shelter dogs' welfare: Reflections on the no-kill policy on free-ranging dogs in Italy revisited on the basis of 15years of implementation, *133*, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.046>
- Cobb, M. L., Iskandarani, K., Chinchilli, V. M., & Dreschel, N. A. (2016). A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. *Domestic Animal Endocrinology*, *57*, 31–42. <http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.04.003>
- Davenport, M. D., Tiefenbacher, S., Lutz, C. K., Novak, M. A., & Meyer, J. S. (2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology*, *147*(3), 255–261. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.01.005>
- Dawkins, M. S. (2004). Using behaviour to assess animal welfare, *13*(13), s3–7. <http://doi.org/10.1177/1091581812471490>
- Dehasse, J., & Schroll, S. (2005). The influence of the experimenter's expectancy in the results of the assessment of appeasing pheromones in stress of police dogs (*Canis familiaris*) during training. *Applied Animal Behaviour Science* (pp. 1–3). Minneapolis.
- Demontigny-Bédard, I., & Frank, D. (2018). Developing a Plan to Treat Behavior Disorders, *48*(3), 351–365. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.004>
- Denenberg, S., & Landsberg, G. M. (2008). Effects of dog-appeasing pheromones on anxiety and fear in puppies during training and on long-term socialization, *233*(12).
- Denham, H. D. C., Bradshaw, J. W. S., & Rooney, N. J. (2014). Repetitive behaviour in kennelled domestic dog: stereotypical or not? *Applied Animal Behaviour Science*, *128*, 288–294. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.007>
- Di Cerbo, A., Sechi, S., Canello, S., Guidetti, G., Fiore, F., & Cocco, R. (2017). Behavioral Disturbances: An Innovative Approach to Monitor the Modulatory Effects of a Nutraceutical Diet. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (119), e54878–9. <http://doi.org/10.3791/54878>
- Fragó, T., Pongrácz, P., Range, F., Virányi, Z., & Miklósi, Á. (2010). “The bone is mine”: affective and referential aspects of dog growls, *79*(4), 917–925. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.01.005>
- Frank, D., Beauchamp, G., & Palestrini, C. (2010). Systematic review of the use of pheromones for treatment of undesirable behavior in cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *236*(12), 1308–1316. <http://doi.org/10.2460/javma.236.12.1308>
- Gaines, S. A. (2008). Kennelled dog welfare - effects of housing and husbandry.

- Gandia, E. M., & Mills, D. S. (2006). Signs of travel-related problems in dogs and their response to treatment with dog-appeasing pheromone. *Veterinary Record*, *159*(5), 143–148. <http://doi.org/10.1136/vr.159.5.143>
- Gaultier, E., Bonnafous, L., Bougrat, L., Lafont, C., & Pageat, P. (2005). Comparison of the efficacy of a synthetic dog-appeasing pheromone with clomipramine for the treatment of separation-related disorders in dogs. *Veterinary Record*, *156*(17), 533–538. <http://doi.org/10.1136/vr.156.17.533>
- Gaultier, E., Bonnafous, L., Falewée, C., Bougrat, L., & Lafont-Lecuelle, C. (2009). Efficacy of dog-appeasing pheromone in reducing behaviours associated with fear of unfamiliar people and new surroundings in newly adopted puppies, *164*, 708–714.
- Gaultier, E., Bonnafous, L., Vienet-Legué, D., Falewée, C., Bougrat, L., Lafont-Lecuelle, C., & Pageat, P. (2008). Efficacy of dog-appeasing pheromone in reducing stress associated with social isolation in newly adopted puppies, *163*, 73–80.
- Glenk, L. M., Kothgassner, O. D., Stetina, B. U., Palme, R., Kepplinger, B., & Baran, H. (2014). Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study, *9*(3), 98–106. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.02.005>
- Grigg, E. K., & Piehler, M. (2015). Influence of dog appeasing pheromone (DAP) on dogs housed in a long-term kennelling facility. *Veterinary Record*, *2*, 1–5. <http://doi.org/10.1136/vetreco-2014-000098>
- Grigg, E. K., Nibblett, B. M., Robinson, J. Q., & Smits, J. E. (2017). Evaluating pair versus solitary housing in kennelled domestic dogs (*Canis familiaris*) using behaviour and hair cortisol: a pilot study, *4*(1), e000193–15. <http://doi.org/10.1136/vetreco-2016-000193>
- Gunaratnam, P., & Wilkinson, G. T. (1983). A study of normal hair growth in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, *24*(7), 445–453. <http://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1983.tb00384.x>
- Haverbeke, A., Pluijmakers, J., & Diederich, C. (2015). Behavioral evaluations of shelter dogs: Literature review, perspectives, and follow-up within the European member states's legislation with emphasis on the Belgian situation, *10*(1), 5–11. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.07.004>
- Held, S. D. E., & Špinka, M. (2011). Animal play and animal welfare, *81*(5), 891–899. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007>
- Hennessy, M. B. (2013). Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review, *149*(1-4), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.004>
- Hermiston, C., Montrose, V. T., & Taylor, S. (2018). The effects of dog-appeasing pheromone spray upon canine vocalizations and stress-related behaviors in a rescue shelter, *26*, 11–16. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.03.013>

- Herron, M. E., Kirby-Madden, T. M., & Lord, L. K. (2014). Effects of environmental enrichment on the behavior of shelter dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *244*(6), 687–692. <http://doi.org/10.2460/javma.244.6.687>
- Hubrecht, R. (1993). A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs, *37*(4), 345–361. [http://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90123-7](http://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90123-7)
- Karlson, P., & Luscher, M. (1959). “Pheromones”: a new term for biologically active substances, *183*, 55–56.
- Kekan, P. M., Ingole, S. D., Sirsat, S. D., Bharucha, S. V., Kharde, S. D., & Nagvekar, A. S. (2017). The role of pheromones in farm animals - A review, *38*(02), 83–93. <http://doi.org/10.18805/ag.v38i02.7939>
- Kim, Y. M., Lee, J.-K., Abd et-aly, A. M., Hwang, S. H., Lee, J.-H., & Lee, S. M. (2010). Efficacy of dog-appeasing pheromone (DAP) for ameliorating separation-related behavioral signs in hospitalized dogs, *51*, 380–384.
- Kovács, K., Kis, A., Pogány, Á., Koller, D., & Topál, J. (2016). Differential effects of oxytocin on social sensitivity in two distinct breeds of dogs (*Canis familiaris*), *74*, 212–220. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.09.010>
- Landsberg, G. M., Beck, A., Lopez, A., Deniaud, M., Araujo, J. A., & Milgram, N. W. (2015). Dog-appeasing pheromone collars reduce sound-induced fear and anxiety in beagle dogs: a placebo-controlled study, *177*(10), 260–260. <http://doi.org/10.1136/vr.103172>
- Levine, E. D., & Mills, D. S. (2008). Long-term follow up of the efficacy of a behavioural treatment programme for dogs with fireworks fears, *162*(20), 657–659.
- Liberles, S. D. (2014). Mammalian pheromones. *Annual Review of Physiology*, *76*, 151–175. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170334>
- Mcglone, J. J., Ballou, M. A., Carroll, J. A., Norman, R. L., Salazar, I., & Hartmeister, F. (n.d.). *Odors and Pheromones : Influences of Olfaction on Behavior , Physiology , and Performance to reduce Stress in Pigs* Copyright 2007 , Nadège Krebs.
- Mendl, M., Burman, O. H. P., Parker, R. M. A., & Paul, E. S. (2009). Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science*, *118*(3-4), 161–181. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.023>
- Meyer, J. S., & Novak, M. A. (2012). Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*, *153*(9), 4120–4127. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1226>
- Mills, D. S., Ramos, D., Estelles, M. G., & Hargrave, C. (2006). A triple blind placebo-controlled investigation into the assessment of the effect of Dog Appeasing Pheromone (DAP) on anxiety related behaviour of problem dogs in the veterinary clinic, *98*(1-2), 114–126. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.08.012>

- Mills, D., Karagiannis, C., & Zulch, H. (2014). Stress-its effects on health and behavior: A guide for practitioners. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(3), 525–541. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.01.005>
- Mills, D., Levine, E., Landsberg, G., Horwitz, D., Duxbury, M., Meyer, K., et al. (2005). Current Issues and Research in Veterinary Behavioral Medicine, 1–30.
- Nicola Rooney BSc, P. P., Samantha Gaines BSc, M. P., & Elly Hiby BSc, P. (2009). A practitioners guide to working dog welfare, 4(3), 127–134. <http://doi.org/10.1016/j.jvheb.2008.10.037>
- Osella, M. C., Bergamasco, L., Odore, R., Beck, A., & Gazzano, A. (2015). Adaptive mechanisms in dogs adopted from shelters: a behavioral assessment of the use of a synthetic analogue of the canine appeasing pheromone, 2, 1–13. <http://doi.org/10.4454/db.v1i2.10>
- Owczarczak-Garstecka, S. C., & Burman, O. H. P. (2016). Can Sleep and Resting Behaviours Be Used as Indicators of Welfare in Shelter Dogs (*Canis lupus familiaris*)? *PLoS ONE*, 11(10), e0163620–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0163620>
- Pageat, P. (2010). Pheromonotherapy in dogs.
- Pageat, P. (2001, January 2). Pig appeasing pheromones to decrease stress anxiety and aggressiveness.
- Part, C. E., Kiddie, J. L., Hayes, W. A., Mills, D. S., Neville, R. F., Morton, D. B., & Collins, L. M. (2014). Physiological, physical and behavioural changes in dogs (*Canis familiaris*) when kennelled: testing the validity of stress parameters. *Applied Animal Behaviour Science*, 133, 260–271. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.018>
- Péter, P., Éva, S., Anna, K., András, P., & Ádám, M. (2018, October 24). More than noise? - Field investigations of intraspecific acoustic communication in dogs (*Canis familiaris*). <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.08.003>
- Pierotti, P. (2016). Clinical applications of pheromones in dogs, 2, 1–7. <http://doi.org/10.4454/db.v2i2.32>
- Protopopova, A. (2016). Effects of sheltering on physiology, immune function, behavior, and the welfare of dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 159, 95–103. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.03.020>
- Rault, J.-L., van den Munkhof, M., & Buisman-Pijlman, F. T. A. (2017). Oxytocin as an Indicator of Psychological and Social Well-Being in Domesticated Animals: A Critical Review. *Frontiers in Psychology*, 8(SEP), 1521. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.01521>
- Roberts, S. A., Simpson, D. M., Armstrong, S. D., Davidson, A. J., Robertson, D. H., McLean, L., et al. (2010). Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biology*, 8(1), 75. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-8-75>
- Rodriguez, I. (2004). Pheromone receptors in mammals. *Hormones and Behavior*, 46(3), 219–230. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.014>

- Roth, L. S. V., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 19631–7. <http://doi.org/10.1038/srep19631>
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589–601. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
- Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M. G., & Stefanon, B. (2015). Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context, 10(4), 302–306. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.03.011>
- Scalia, B., Alberghina, D., & Panzera, M. (2017). Influence of low stress handling during clinical visit on physiological and behavioural indicators in adult dogs: a preliminary study. *Pet Behaviour Science*, 0(4), 20–22. <http://doi.org/10.21071/pbs.v0i4.10131>
- Scullion Hall, L. E. M., Robinson, S., Finch, J., & Buchanan-Smith, H. M. (2017). The influence of facility and home pen design on the welfare of the laboratory-housed dog. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 83, 21–29. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.09.005>
- Sheppard, G., & Mills, D. S. (2003). Evaluation of dog-appeasing pheromone as a potential treatment for dogs fearful of fireworks. *Veterinary Record*, 152(14), 432–436. <http://doi.org/10.1136/vr.152.14.432>
- Sheriff, M. J., Ben Dantzer, Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869–887. <http://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>
- Sherman, B. L., & Serpell, J. A. (2008). Training Veterinary Students in Animal Behavior to Preserve the Human–Animal Bond. *Jvme*, 35(4), 496–502. Retrieved from <https://www.researchgate.net/>
- Siniscalchi, M., McFarlane, J. R., Kauter, K. G., Quaranta, A., & Rogers, L. J. (2013). Cortisol levels in hair reflect behavioural reactivity of dogs to acoustic stimuli. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 49–54. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.02.017>
- Siracusa, C., Manteca, X., Cuenca, R., Alcalá, M., Alba, A., Lavín, S., & Pastor, J. (2010). Effect of a synthetic appeasing pheromone on behavioral, neuroendocrine, immune, and acute-phase perioperative stress responses in dogs. *Scientific Reports*, 237(6), 637–681.
- Soares, G. M., Luz, R. P., & Diel, L. B. K. (2012). Nota preliminar sobre o uso de feromônio para reduzir sinais de ansiedade e medo nos cães em ambiente de banho e tosa, (3), 30–34.
- Stellato, A. C., Flint, H. E., Widowski, T. M., Serpell, J. A., & Niel, L. (2017). Assessment of fear-related behaviours displayed by companion dogs (*Canis familiaris*) in response to social and non-social stimuli, 188, 84–90. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.12.007>

- Surov, A. V., & Maltsev, A. N. (2016). Analysis of chemical communication in mammals: Zoological and ecological aspects. *Biology Bulletin*, *43*(9), 1175–1183. <http://doi.org/10.1134/S1062359016110157>
- Tallo-Parra, O., Manteca, X., Sabes-Alsina, M., Carbajal, A., & Lopez-Bejar, M. (2015). Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal : an International Journal of Animal Bioscience*, *9*(6), 1059–1064. <http://doi.org/10.1017/S1751731115000294>
- Taylor, K., & Mills, D. S. (2007). A placebo-controlled study to investigate the effect of Dog Appeasing Pheromone and other environmental and management factors on the reports of disturbance and house soiling during the night in recently adopted puppies (*Canis familiaris*), *105*(4), 358–368. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.11.003>
- Temple, G., & Johnson, C. (2009). *Animals make us Human*. United States of America: Houghton Mifflin Harcourt.
- Tod, E., Brander, D., & Waran, N. (2005). Efficacy of dog appeasing pheromone in reducing stress and fear related behaviour in shelter dogs, *93*(3-4), 295–308. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.01.007>
- Travain, T., Colombo, E. S., Heinzl, E., Bellucci, D., Previde, E. P., Prato-Previde, E., & Valsecchi, P. (2015). Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)-A pilot study, *10*(1), 17–23. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.11.003>
- Wells, D., & G Hepper, P. (1992). The Behaviour of Dogs in a Rescue Shelter, *1*(3), 171–186. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ufaw/aw/1992/00000001/00000003/art00004>
- Wyatt, T. D. (2009). Fifty years of pheromones. *Nature*, *457*(7227), 262–263. <http://doi.org/10.1038/457262a>
- Wyatt, T. D. (2014). *Pheromones and Animal Behavior* (2nd ed., pp. 1–424). Cambridge : Cambridge University Press. Retrieved from <http://b-ok.xyz/book/2316588/1215d8>
- Yeates, J. W., & Main, D. C. J. (2008). Assessment of positive welfare: A review, *175*(3), 293–300. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.009>

## **CAPÍTULO 2.**

**Efecto de un nutracéutico (Adaptil® comprimido express)**

**sobre el bienestar de perros en colectivos.**

## I. RESUMEN

Generalmente los perros que viven en colectivos dentro de refugios, instalaciones de investigación o criaderos se enfrentan a condiciones de vida subóptimas que comprometen su bienestar. Son múltiples los factores que contribuyen para que estos animales experimenten estrés crónico.

Son varias las estrategias que se pueden llevar a cabo en dichos sitios para evitar o reducir el impacto de estos factores en la salud física y emocional de sus habitantes, reducir sus niveles de estrés y mejorar en general su calidad de vida. Una forma de evaluar la necesidad y eficacia de dichas estrategias es mediante indicadores fisiológicos y conductuales.

En este estudio se usó un indicador conductual (etograma) y uno fisiológico (determinación de la concentración de cortisol en pelo) para evaluar el efecto de un comprimido nutracéutico (Adaptil® express) sobre el bienestar de ocho perros viviendo en colectividad.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en las siguientes conductas: *bouncing* ( $P=0.016$ ), *jump* ( $P<0.0001$ ), *standing* ( $P<0.0045$ ), *standing in rear legs* ( $P=0.0002$ ), *sitting* ( $P=0.015$ ), *exploring* ( $P=0.0023$ ), *hide* ( $P=0.009$ ), *yawn* ( $P=0.037$ ) y *lip licking* ( $P=0.017$ ). No se observó diferencia entre tratamientos para la concentración de cortisol en pelo ( $P=0.927$ ).

## II. INTRODUCCIÓN

La investigación sólida sobre la fisiología de la nutrición apareció hasta el siglo XIX. Y hasta hace poco más de un siglo la industria de alimentos para mascotas comenzó a crecer a un ritmo acelerado (Guy, 2016). Su auge fue tal, que actualmente la mitad de la ingesta diaria del 90% de la población canina de países desarrollados se basa en dietas comerciales (Parr, 2014),(DeNapoli, 2000).

Al ser los canes carnívoros oportunistas, los ingredientes de estos productos se eligen con base a 23 vitaminas y minerales que les son esenciales (Thompson, 2008). Aunque también son considerados aspectos como su palatabilidad, digestibilidad, disponibilidad, costo y factores sociales. Las prácticas de alimentación para perros reflejan la ideología e identidad de los propietarios (Kanakubo, 2015) y están influenciadas por las tendencias sociales y culturales que imperan en su propia conducta alimentaria (Michel, 2006; Okin, 2017). En las últimas dos décadas se ha acentuado el interés general por alternativas naturales (Bernal, 2011) que promuevan la salud y el bienestar (Kirk, 2018). Ello ha provocado una tendencia en la población a elegir alimentos no solo nutricionalmente adecuados, sino que además aporten beneficios que mejoren la calidad de vida. Esta tendencia puede estar influenciada por algunos de los siguientes motivos:

Aumento en la esperanza de vida. La nueva biotecnología, la investigación en nutrición animal, el cuidado veterinario y la implicación de los propietarios han aumentado considerablemente la longevidad de las mascotas (de Godoy, 2016) (Kirk, 2018). Se estima que ésta se ha duplicado en los últimos 40 años. Sin embargo, el envejecimiento es también el mayor factor de riesgo para algunas enfermedades debilitantes y elevada comorbilidad (Mallikarjun, 2016)

Acceso a medicamentos. Como consecuencia de lo anterior, ha habido un incremento en el gasto sanitario. En algunas regiones el acceso a medicamentos de última generación es escaso, limitado (Orlando, 2018) o costoso, sobretodo cuando son terapias a largo plazo (Gazzano, 2018), como es el caso de los problemas comportamentales.

Relación de alimentación con enfermedades. La atribución de determinadas virtudes a los alimentos relacionadas a la salud se remonta a más de dos mil años. Ya en la década de los 50's se sugirió una interacción bidireccional entre nutrición, inmunidad y enfermedad infecciosa (de Godoy *et al.*, 2016) y desde entonces la epidemiología ha enfatizado la influencia de la dieta con la incidencia de padecimientos no infecciosos y crónicos (Santini, 2017) tanto en perros como en otras especies (Case, 2011).

Interés por terapias no farmacológicas. En el imaginario colectivo, se considera a los medicamentos como productos químicos con grandes beneficios pero también con un importante riesgo potencial debido a los efectos adversos transitorios o crónicos (Redfern, 2017). Este estigma y proyección se puede incrementar cuando se trata de medicamentos psicotrópicos (Radosta, 2012). En la década de los 90's el uso de productos naturales en personas se incrementó cerca del 400%. Y en la pasada, cerca del 30% de los

dueños de mascotas usaban o consideraban el uso de ingredientes no tradicionales en sus animales, mientras que aproximadamente el 90% de los veterinarios lo comercializaba (Boothe, 2004)

Entre otros, los planteamientos expuestos han motivado la génesis de opciones alimenticias y terapéuticas de origen natural para perros que son podrían ser más seguras o presentar menos efectos secundarios indeseables (Michel, 2006). Por ello, su estudio y validación es un área de actual interés científico (Santini *et al.*, 2017).

### **2.1. Alimentos Funcionales y Nutraceuticos.**

El término “nutraceutico” (acrónimo de las palabras "nutrición" y "farmacéutico") fue acuñado en 1989. Se define como un suplemento dietético (de origen animal o vegetal) presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.) que si se administra en dosis superiores a la existente en los alimentos tiene un efecto mayor al que posee en él (Luengo, 2007) y una actividad beneficiosa para la salud más allá de su valor nutricional (Santini *et al.*, 2017). Su inclusión en la dieta puede ser auxiliar en prevenir la aparición de patologías y quizá evitar o retrasar la necesidad de emplear productos farmacéuticos (Pérez, 2006). Comúnmente, el término es usado como sinónimo de “alimento funcional”, pero, los nutraceuticos son aquellos nutrientes (conocidos o no) dentro de un alimento funcional responsables de que a estos se les atribuyan funciones de mantenimiento y potenciación de la salud (Luengo, 2007).

### **2.2. Alimentación, compuestos nutraceuticos y conducta.**

Los nutraceuticos en perros (Di Cerbo, *et al.*, 2017a) se han estudiado para promover la salud de la piel (Case *et al.*, 2011), en patologías del tracto urinario (Brown, 2004), enfermedades gastrointestinales (Sintean, 2018),(Center, 2004), problemas articulares (Vandeweerd *et al.*, 2012) (Vassalotti *et al.*, 2017), patologías oculares (Destefais *et al.*, 2017), padecimientos oncológicos (Roudebush, 2004) y otras (Ciribé *et al.*, 2018).

Si bien, la creencia sobre la influencia que tiene la dieta en el estado de ánimo y el comportamiento es muy popular (Young, 2002), en la literatura existen relativamente pocas investigaciones al respecto (Houpt, 2003). Y rara vez se considera uno de los posibles factores contribuyentes a problemas conductuales en caninos (Bosch, 2009). El campo que permanece más estudiado en este tema es la relación que tienen ciertos nutrientes con los cambios de comportamiento asociados al envejecimiento, ya que los perros se han utilizado como modelo para los humanos (Bosch, 2009)

La nutrición en general puede ser un apoyo importante para perros con estrés o ansiedad. De hecho se comercializan alimentos formulados con el objetivo de provocar un efecto ansiolítico (Di Cerbo *et al.*, 2017b; Pageat, 2010) e incluso mejorar los síntomas digestivos y cutáneos asociados. Además, en la última década se ha difundido el uso de los nutraceuticos como apoyo a la neurofarmacología (Vicinanza, 2013).

Por lo que la posibilidad de usarlos en conjunto con otras estrategias pudiera convertirse en una herramienta útil para reducir problemas de comportamiento en perros (Manteca, 2011), así como para su tratamiento y prevención.

Todo lo expuesto anteriormente, motiva la realización de esta investigación. Con ella se pretende colaborar en el estudio sobre la relación entre un comprimido nutraceutico (Adaptil® express) y su efecto ansiolítico para mejorar el bienestar de perros que viven en colectivo.

### 2.3. Adaptil® comprimidos express

Adaptil® express comprimidos es un nutraceutico no sujeto a prescripción veterinaria indicado para el alivio rápido del estrés en perros en situaciones ocasionales como ruidos, petardos, tormentas, viajes o visitas al veterinario. Según el fabricante, los efectos son perceptibles en menos de 2 horas después de su administración (Ceva, 2015). La presentación comercial es en cajas de 10 comprimidos cuya composición se muestra en el Cuadro 10.

Matriz	Cantidad (mg)
L-triptófano	100
L-teanina	100
GABA	100
Vitamina B1 (Tiamina)	1
Vitamina B6 (Piridoxina)	9
Vitamina B12 Cobalamina	0.01
Vitamina B3 Niacina	2.5
Inositol	20

Cuadro 10. Composición de Adaptil® express. Fuente: CEVA laboratorios

Respecto a sus ingredientes, pocos son los reportes científicos sobre su uso, biodisponibilidad o incluso su requerimiento nutricional en perros. (Schneider, 2013) (Boothe, 2004) (Santini *et al.*, 2017).

#### 2.3.1. Triptófano

El triptófano es el aminoácido (aa) relacionado con el comportamiento que más se ha investigado (Vicinanza, 2013). Es precursor de la serotonina, por lo que el incremento de su concentración provoca un aumento de la liberación de este neurotransmisor. Esta relación depende de su ingesta con los alimentos y de la concentración de otros aminoácidos (presentes mayormente en dietas altamente proteicas), con los cuales compite por las mismas proteínas transportadoras para atravesar la barrera

hematoencefálica (Bosch, 2009). Se ha documentado que en humanos su agotamiento o depleción ocasiona la aparición de ansiedad, bajo estado de ánimo y síntomas depresivos (Di Cerbo, *et al.*, 2017b) (Sechi *et al.*, 2017).

### **2.3.2. L-Teanina**

Es un aminoácido no proteico, análogo estructural de la L-glutamina y rico en triptófano, que se presenta de forma natural en las hojas de té verde (*Camellia sinensis*). Su uso médico se ha encontrado en antiguos libros de farmacología (Coppock, 2016). En personas parece aumentar el nivel de GABA, dopamina y serotonina en el SNC, disminuir la frecuencia cardíaca durante la ansiedad crónica, (Di Cerbo, *et al.*, 2017b), modular el estrés emocional y potenciar la capacidad de aprendizaje (Cicero, 2018). Sin embargo su posible efecto clínico en perros permanece poco explorado (Araujo *et al.*, 2010).

#### **2.3.2.1. GABA Acido gamma-aminobutírico**

Este neurotransmisor se encuentra en cantidades copiosas en el cerebro. Posee un efecto inhibitor sobre la ansiedad y los desordenes relacionados con el estrés (Di Cerbo, *et al.*, 2017a). Y el incremento de su actividad parece asociarse a una reducción del miedo y ansiedad (Argüelles, 2017) (Cicero, 2018).

#### **2.3.2.2. Vitaminas B1, B3, B6 y B12**

Tienen un papel en reacciones enzimáticas del metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos. Están indicados en neuropatías (Cicero, 2018) .

#### **2.3.2.3. Inositol**

Es un compuesto orgánico hidrosoluble sintetizado por la mayoría de los animales gracias al metabolismo bacteriano de los carbohidratos en el intestino (Case *et al.*, 2011). Es importante para la integridad de las membranas celulares y para la composición de la vaina de mielina en el sistema nervioso (FEEDAP, 2016). A pesar de no haber estudios específicos de tolerancia o toxicidad para perros, su adición a la dieta se utiliza con frecuencia con fines ansiolíticos (Case *et al.*, 2011).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Instalaciones

La Granja de investigación (Figura 10) está ubicada en la Facultad de Veterinaria (FV) de la Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra, España 41°30'01"N 2°06'28"E).

Este lugar cuenta con dos edificios: Uno de ellos posee un recinto para cuidados veterinarios, laboratorio, almacén para alimento, sala de limpieza y vestidor para el personal, y el edificio aledaño posee 24 perreras en las que se alojan de manera individual o en pareja 30 perros de raza Beagle. En el centro de las dichas perreras, se ubican dos patios exteriores de 90 m<sup>2</sup> para el ejercicio y recreo de los animales.

Cada jaula, de 4m<sup>2</sup> está equipada con plataforma elevada para el reposo del animal y un bebedero automático (Figura 9). Se mantienen a una temperatura promedio de 22°C con ventilación controlada.



Figura 9. Canil de los perros

Figura 10. Localización de la granja de perros de la FV

### 3.2. Animales

Para este estudio se usaron 8 perros raza Beagle (4 machos y 4 hembras) pertenecientes a la Granja de la FV de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Cada animal estaba identificado con tarjeta de datos en la puerta del recinto (Cuadro 11).

Nombre	Sexo	Estado reproductivo	Fecha nacimiento	Fecha de alta	Edad (años)	Peso (kg)
Aleta	h	fértil	2008	11/9/2015	9	11.02
Blanca	h	fértil	11/24/2011	2/8/2013	6	16.06
Crossa	h	fértil	6/26/2011	11/24/2015	6	9.56
Dandy	m	fértil	10/21/2014	11/18/2015	3	18.06
Fosca	h	fèrtil	7/24/2007	4/10/2013	10	9.92
Negritu	m	fértil	5/12/2008	4/10/2013	9	10.18
Pigat	m	fèrtil	4/14/2008	4/10/2013	9	11.20
Pirata	m	fértil	2007	n/d	10	12.96

Cuadro 11. Perros que participaron en el estudio

#### 3.2.1.1. Criterios de inclusión y exclusión

Se eligieron animales clínicamente sanos, que al momento del estudio no estuvieran bajo tratamiento farmacológico cuya interacción conocida pudiera ser motivo de sesgo (psicofármacos), y que durante el mismo no fueran usados para ningún otro experimento que involucrara estrés y/o dolor. No se tomaron en cuenta edad, sexo o peso como factores de exclusión.

#### 3.2.1.2. Manejo

La rutina de los perros fue la habitual. Eran alimentados con pienso una vez al día (9 am aproximadamente) y el agua era administrada *ad libitum*. La salida al patio de ejercicio se realizaba una vez al día.

### 3.2.2. Diseño del Experimento

El período de estudio se dividió en dos intervalos de tiempo: etapa control (T1), correspondiente al intervalo de tiempo entre el día 0 - 28, etapa o fase de tratamiento (T2) correspondiente al tiempo entre el día 30 - 45 (Cuadro 12) y (Figura 11).

Día	Tratamiento
	T1 o etapa control
d0	Test de acercamiento Videograbación de los 8 individuos
d0-d15	Revisión de los videos y registro de las conductas efectuadas por los 8 perros.
d28	Toma de muestra de pelo para la determinación de [CP] en área rasurada el día 0.
	T2 o etapa tratamiento
	Videograbación de los 8 individuos
d30 - d45	Revisión de los videos y registro de las conductas efectuadas por los 8 perros. Aplicación de Adaptil spray. Toma de muestra de pelo para la determinación de [CP] en área rasurada el día 0
d52	Test de acercamiento

Cuadro 12 Descripción del modelo experimental

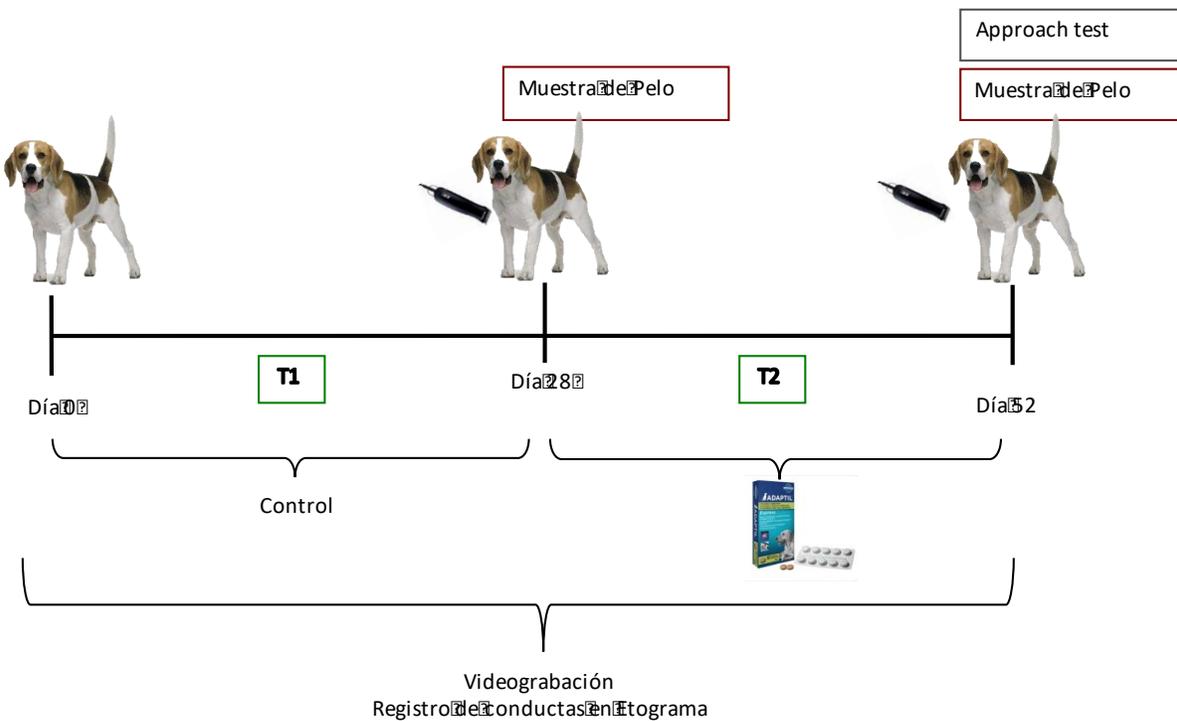


Figura 11. Diseño del experimento con Adaptil Comprimidos Express

### 3.2.3. Test de acercamiento

Se realizó con el objetivo de conocer la actitud que los ocho perros del estudio mostraban hacia una persona desconocida y evaluar si dicha actitud difería en presencia y ausencia de Adaptil® spray. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- h) Una persona desconocida caminaba en dirección lineal, de manera suave y lenta, con la mirada en el piso, desde la puerta de entrada de la perrera hasta posarse frente a la puerta de la jaula previamente acordada con el investigador.
- i) Una vez ahí contaba mentalmente 3 segundos y giraba su cuerpo (90° a la derecha) hasta quedar de frente hacia la jaula/perro manteniendo la vista en el piso.
- j) En ese sitio contaba nuevamente 3 segundos de manera mental y se posaba en la señal “X” marcada en el piso (a un paso de la jaula aproximadamente).
- k) Al llegar a la “X” miraba hacia el perro y acercaba la mano hasta casi tocar la parte de la jaula que quedaba al nivel de su cintura.
- l) Acto seguido se ponía en cuclillas de manera lateral a la jaula (90° a la derecha) sin mirar al animal y permanecía en dicha posición 5 segundos.
- m) Acto seguido, el voluntario se ponía de pie y se dirigía hacia la puerta de salida, de manera lenta y tranquila, con la mirada en el piso.
- n) El procedimiento se repitió 1 vez por jaula y animal

Los resultados del test se expresaron de la siguiente manera:

Valor	Comportamiento ante el extraño
0	el perro permaneció indiferente al extraño o lo ignoró
1	el perro se mostró amistoso, tranquilo y sociable con el extraño
2	el perro presentó posturas corporales bajas, de evasión s o signos asociados a miedo
3	el perro dio indicios de agresividad hacia el extraño.

*Cuadro 13. Valores para el Test de Acercamiento*

### 3.2.4. Observación de conducta

Las conductas individuales e intraespecíficas realizadas por los 8 animales del estudio (aquellas relacionadas con emociones positivas y emociones negativas) fueron observadas por el investigador en el edificio anexo a las perreras mediante un circuito cerrado de grabación previamente instalado y registradas con el uso de un etograma (Cuadros 14) durante ambos estudios.

Las conductas fueron agrupadas en 7 categorías: Postura, Social, Oral, Repetitivas, Destructivas, Acicalamiento y Vocalizaciones. Cada una de ellas con 2 o más subcategorías, descritas en el Cuadro 15

Para lograr consistencia en las observaciones, fue siempre el mismo investigador quien registró las conductas observadas.

Se utilizó la técnica de muestreo focal y continuo. El investigador mantenía su atención durante cinco minutos en un perro y todas las acciones del etograma que realizaba eran registradas. Mientras tanto, las actividades de los otros animales en el grupo eran ignoradas. Cuando se terminaban los cinco minutos, se empezaba la sesión de observación con el siguiente animal. Esto continuó hasta que todos los animales del grupo fueron observados. Se hicieron tres sesiones por animal durante tres semanas.

SUJETO:

Tratamiento:

# Semana:

Día \_\_\_\_\_ Mes \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_\_

TIME	BEHAVIORS																											Other	Remarks	
	Posture							Social					Oral				Repetitive				Destructive			Groom		Vocalization				
	ST	SR	S	L	E	H	LP	T	PD	IT	AG	LL	Y	C	D	PA	CC	B	J	D/S	C	LC	SG	OG	BK	G	CY			
TOTAL																														

Cuadro 14. Etograma

CATEGORÍA	CLAVE	CONDUCTA	DESCRIPCIÓN
POSTURE	ST	Stand	Todas las extremidades en contacto con el suelo
	SR	Stand Rear legs	Extremidades delanteras apoyadas sobre la pared o reja
	S	Sit	Grupa apoyada en el suelo y extremidades anteriores extendidas con los cojinetes apoyados en el suelo
	L	Lay	El perro permanece inactivo, acostado lateral, dorsal o ventralmente, calmado y puede tener o no los ojos cerrados.
	E	Explore	El perro camina de un punto a otro, olfatea e investiga el recinto
	H	Hide	El perro se posiciona debajo de la plataforma ubicada en el recinto, de manera tal que parte del cuerpo o su totalidad permanece oculto a la cámara
	LP	Low Postures	El perro muestra signos y posturas que están relacionadas con el miedo (orejas hacia atrás, cola que cuelga baja o pegada entre las piernas, contacto visual indirecto, etc.)
SOCIAL	T	Play with Toy	El perro interactúa con los juguetes proporcionados. Incluye mordiscos, sacudidas o cualquier manipulación
	PD	Play with Dog	El perro mantiene una interacción lúdica positiva con el compañero de jaula o el perro vecino
	IT	Interaction	El perro mantiene contacto hacia el compañero de la jaula o el vecino. Se toman en cuenta lamidos, miradas sostenidas, y cualquier contacto físico buscado
	AG	Agressive	El perro muestra signos y posturas de agresión (peso sobre las patas traseras, cola abajo, cola entre las piernas, rígido, pelos erizados, orejas erguidas, pupilas dilatadas y mirada fija, hocico tenso, nariz arrugada, dientes expuestos con belfos elevados)
ORAL	LL	Lip Licking	El perro pasa la lengua repetidamente sobre su morro. No se toma en cuenta si el perro bebió agua o bostezo antes de realizar la conducta.

	Y	Yawn	Bostezo
	C	Coprofagia	El perro ha sido sorprendido lamiendo o ingiriendo las heces propias o del compañero
	D	Drink	Beber agua o simular hacerlo
REPETITIVE	PA	Pacing	Movimiento continuo de ida y vuelta entre los límites de la jaula o caminar en una ruta fija (generalmente a lo largo de una pared)
	CC	Circling	El perro se mueve en un círculo repetitivo, no variado, alrededor de la jaula
	B	Bounce	El perro salta repetitivamente delante de la valla o la pared manteniendo los miembros posteriores en el suelo
	J	Jump	Salta al aire, ya sea para hacer contacto con un objeto o sin ningún motivo aparente. Las patas traseras deben de haber estado separadas del piso aunque sea por un breve instante
DESTRUCTIVE	DS	Dig/Scratch	El perro araña el suelo o su plataforma con las patas delanteras en un movimiento de excavación de manera repetida. No se toma en cuenta si el animal lo hace previo a echarse
	LC	Lick Cage	El perro mastica la cerca, la cama o la plataforma de manera repetitiva
GROOM	SG	Self Groom	Conductas dirigidas hacia el propio cuerpo del perro; por ejemplo, rascarse o lamerse la piel o el pelo
	OG	Other Groom	El perro mastica o lame la piel o pelo del compañero de jaula o vecino
VOCALIZATION	BK	Bark	Vocalización abrupta cuya frecuencia es captada por los micrófonos
	G	Growl	Vocalización poco estridente, ronca y generalmente de tono bajo
	CY	Cry	Vocalizaciones repetidas, relativamente breves y de tono variable
OTHER	Otras conductas		Conductas no presentes en las anteriores categorías (eliminación, <i>shaking</i> , <i>paw</i> , etc.)

Cuadro 15. Descripción de los parámetros comportamentales

### 3.2.5. Administración de Adaptil® express comprimidos

Los comprimidos se administraron siguiendo las recomendaciones del fabricante una vez al día a la misma hora durante toda la Etapa T2. A los perros de hasta 10 kg se les proporcionó ½ comprimido y a aquellos entre 10 y 20 kg un comprimido completo sin alimento añadido.

Adaptil comprimidos parece ser sumamente palatable, ya que la ingestión fue totalmente voluntaria y espontánea. Esto es un componente importante en el tratamiento de cualquier problema de comportamiento, sobretodo en administraciones crónicas, ya que se evita cualquier confrontación con la mascota y aversión al medicamento. Luchar con el perro para medicarlo no solo disminuye la calidad de vida tanto del paciente y de la persona que lo administra, sino reduce la posibilidad de cumplir el plan terapéutico y su probabilidad de éxito (Thombre, 2004). Además, la vía oral para perros es uno de los métodos preferidos por la mayoría de sus propietarios, ya que se considera conveniente, poco invasiva y rentable (Ting, 2014).

### 3.2.6. Toma de muestra de pelo y determinación de concentración de cortisol

La determinación de las [C] es uno de los indicadores más usados para determinar estrés (Stellato, 2017). Una razón de ello es su disponibilidad en un gran número de matrices biológicas, entre ellas: el pelo (Beerda, 2000; 1996; Hennessy, 2013). Fuente elegida en este estudio debido a su utilidad en medir estrés crónico.

Antes de iniciar cada uno de los experimentos, se eligió una zona del cuerpo de los perros en la que primara un sólo color, en este caso el blanco. Se optó por el área ventral del cuello (Fig 12), entre las clavículas. Dicha área fue depilada con cortadora de pelo eléctrica al inicio del estudio (d0), tal como sugiere Davenport (2006). Las muestras recogidas el d28 y d45 fueron del pelo de que volvió a crecer en el mismo parche de piel. Con el rasurado, y no con el corte, se producen las condiciones óptimas para la incorporación de esteroides mediante la estimulación del crecimiento de pelo nuevo y no se dejan fuera milímetros de pelo, importantes para un conteo correcto de las [C] (Baciu, 2015). En todo momento evitó lesionar la piel o arrancar folículos pilosos.



Figura 12. Zona elegida para la muestra de CP

Cada muestra capilar pesaba alrededor de 5 g y se almacenó en un lugar seco hasta su análisis. Se evitó el uso directo en bolsas o tubos de plástico debido a que el plástico puede extraer sustancias lipofílicas del pelo. Utilizamos sobres de papel que evitaban la luz directa sin que hubiera riesgo de adulteración biológica o contaminantes (Baciu *et al.*, 2015) que almacenamos a temperatura ambiente hasta su análisis debido a la estabilidad demostrada del cortisol durante períodos largos de tiempo comparado con otras matrices de muestras (Casal, 2017; Meyer, 2014).

La [CP] fue determinada por la técnica ELISA en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la UAB mediante el protocolo descrito por (Tallo-Parra, 2015) (Anexo A).

### **3.2.7. Análisis Estadístico**

Todos las pruebas se realizaron en el programa estadístico “*Statistical Analysis System*” (SAS® 9.2. Institute Inc., Cary, NC). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi cuadrada y se representan como media  $\pm$ SEM, considerando significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Test de acercamiento

Durante el desarrollo de esta prueba, no hubo diferencias entre los dos tratamientos. Los ocho perros mostraron la misma reacción en la etapa control y en la etapa de administración del nutraceutico. Con excepción del Beagles 3 que mostró temor ante la presencia del extraño, los demás mostraron interés por el mismo (Cuadro 16).

Clave y nombre de Perro	T1	T2
(B1) Negritu	1	1
(B2) Pigat	1	1
(B3) Pirata	2	2
(B4) Dandy	1	1
(B5) Fosca	1	1
(B6) Blanca	1	1
(B7) Crossa	1	1
(B8) Aleta	1	1

*Cuadro 16 Reacción de los perros ante un desconocido*

### 4.2. Conducta

En este estudio se detectaron algunos cambios en las conductas estudiadas entre tratamientos.

Algunos comportamientos (posturas asociadas a miedo, agresión y destrucción de jaula) se presentaron en niveles de frecuencia y variación muy bajos (ocurrencia promedio <1) para que los análisis estadísticos fueran lo suficientemente robustos. No se apreciaron diferencias significativas en las categorías referentes a conducta social ( $P=0.30$ ), conductas destructivas ( $P=0.19$ ), conductas de acicalamiento ( $P=0.2$ ) y vocalizaciones ( $P=0.33$ ).

Entre la fase control y la fase tratamiento, se presentaron diferencias significativas en la frecuencia de conductas de Postura, Orales y Repetitivas. Específicamente, hubo una disminución en las medias de “stand”, “stand on rear legs” “sit” “explore” y “hide”. También en “lip licking”, “yawn” y en dos conductas repetitivas (“bounce” y “jump”) (Figuras 13 y 14) (Cuadro 17).

Conducta	P-valor	Media control comprimido	SD	Media comprimido	SD
post_st	<b>0.0045*</b>	2.017	2.326	1.518	2.371
post_sr	<b>0.0002*</b>	0.975	2.853	1.527	4.370
post_s	<b>0.015*</b>	1.45	1.796	1.089	1.399
post_l	0.82	3.017	1.012	2.964	0.967
post_e	<b>0.0023*</b>	1.86	2.951	2.446	5.310
post_h	<b>0.009*</b>	0.108	0.384	0.259	0.668
post_lp	nsv	nsv	nsv	nsv	nsv
posture	0.35	9.425	7.498	9.804	11.371
soc_pt	0.059	0.025	0.274	0	0
soc_pd	0.16	0.092	0.745	0.027	0.211
soc_it	na	3.675	5.754	4.036	6.196
soc_ag	0.3	nsv	nsv	nsv	nsv
social	0.30	3.792	5.990	4.063	6.229
oral_ll	<b>0.017*</b>	0.217	0.611	0.089	0.316
oral_y	<b>0.037*</b>	0.117	0.553	0.036	0.230
oral_c	0.11	0.05	0.254	0.009	0.094
oral_d	0.56	0.083	0.278	0.063	0.278
oral	<b>0.0006*</b>	0.467	1.137	0.196	0.567
rep_pa	0.7	0.067	0.361	0.080	0.359
rep_cc	0.16	0.233	0.764	0.152	0.450
rep_b	<b>0.016*</b>	0.125	0.421	0.268	1.200
rep_j	<b>&lt;0.0001*</b>	0.158	0.859	0.482	2.592
repetitive	<b>0.0007*</b>	0.583	1.537	0.982	3.982
des_ds	0.71	0.167	0.599	0.188	0.665
des_cw	nsv	nsv	nsv	nsv	nsv
des_lc	0.88	0.05	0.254	0.116	0.440
destructive	0.19	0.217	0.651	0.304	0.837
groom_sg	0.23	1.192	1.616	1.027	1.442
goom_og	0.37	0.025	0.203	0.009	0.094

<b>groom</b>	<b>0.2</b>	<b>1.217</b>	<b>1.609</b>	<b>1.036</b>	<b>1.451</b>
voc_bk	0.074	0.258	1.081	0.392	1.448
voc_g	nsv	0.033	0.288	nsv	nsv
voc_cy	0.31	0.042	0.328	0.018	0.189
vocalization	0.33	0.333	1.212	0.411	1.456

*Cuadro 17. Valores medios de conductas entre tratamientos*

*Los efectos significativos se encuentran resaltados en negritas. Para descripción de las categorías referirse al etograma en la página #. Nsv=no hay valores suficientes.*

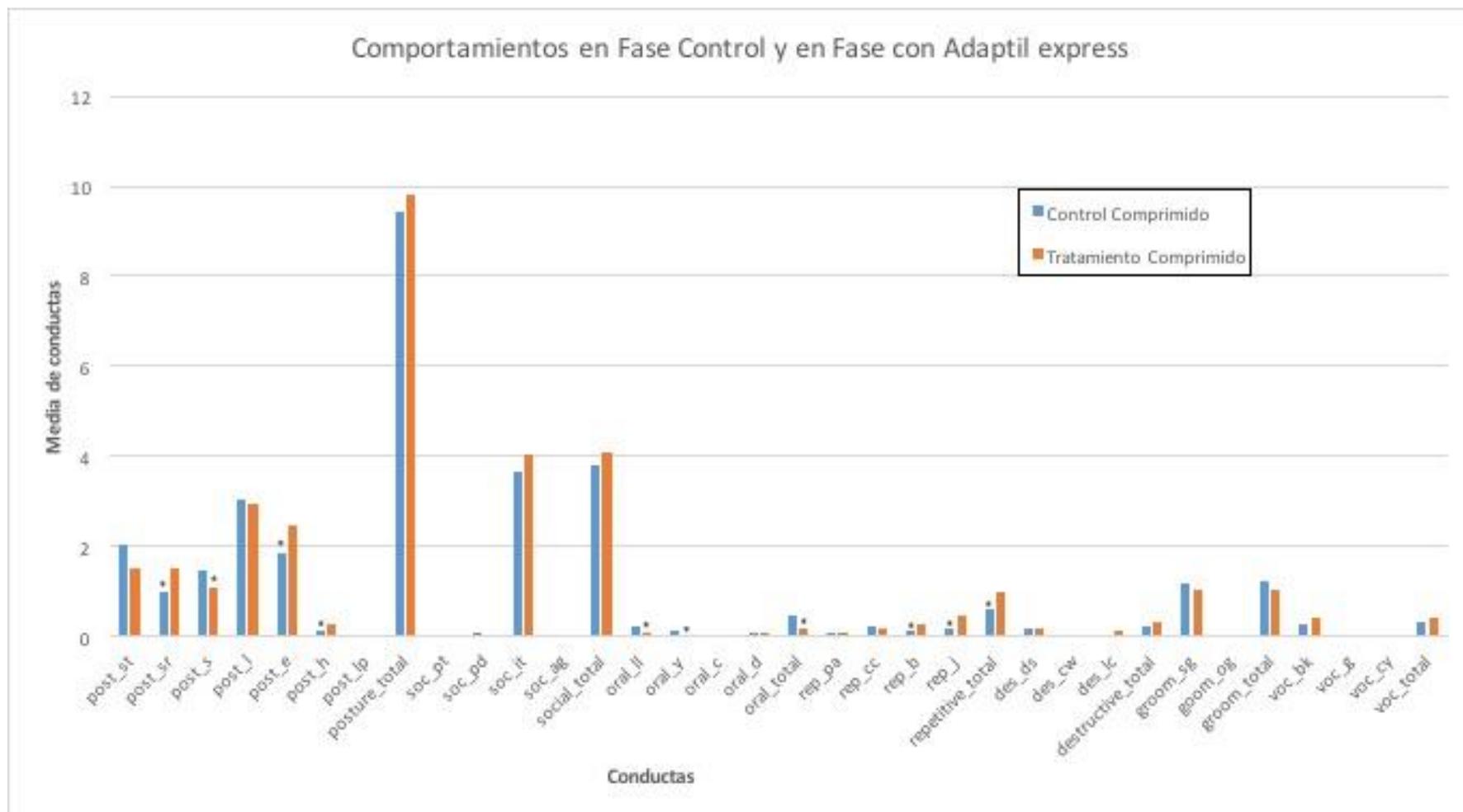


Figura 13. Media de conductas con y sin Adaptil® Express

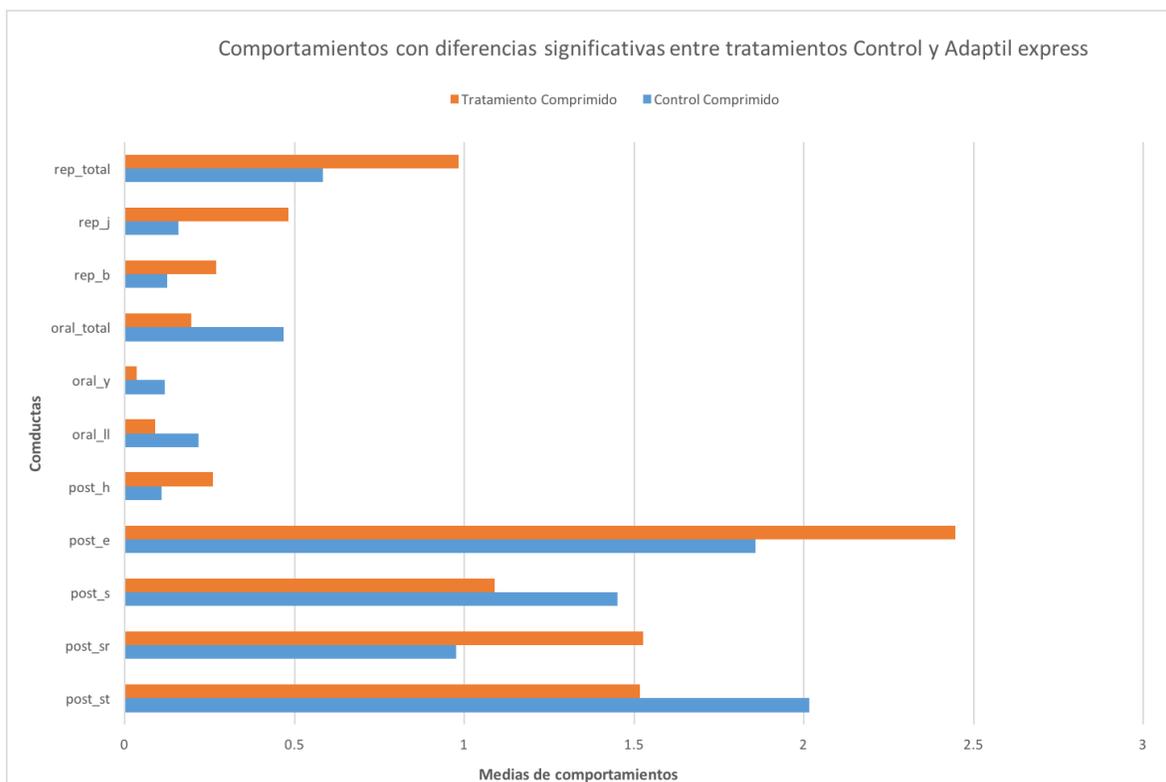


Figura 14. Comportamientos con diferencias significativas entre tratamientos

### 4.3. Toma de muestra de pelo y determinación [C]

La exposición al Adaptil® comprimidos express en este estudio no mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.927$ ) en las concentraciones de cortisol en pelo entre tratamientos (Cuadro 18 y Figura 15). Los valores medios fueron 9.708 y 9.650 pg/mg de pelo para la etapa control y la etapa con nutraceutico respectivamente.

Tratamiento	Pr>F	[CP]	Media	Mínima	Máxima	SD	SE
		(pg/mg*)					
T1 control	0.927	9.708		5.999	14.363	3.043	1.076
T2 comprimido		9.650		6.349	13.094	2.219	0.785

Cuadro 18. Concentración de Cortisol en Pelo con y sin Adaptil Nutraceutico

\*Picogramos concentración de cortisol por mg de pelo

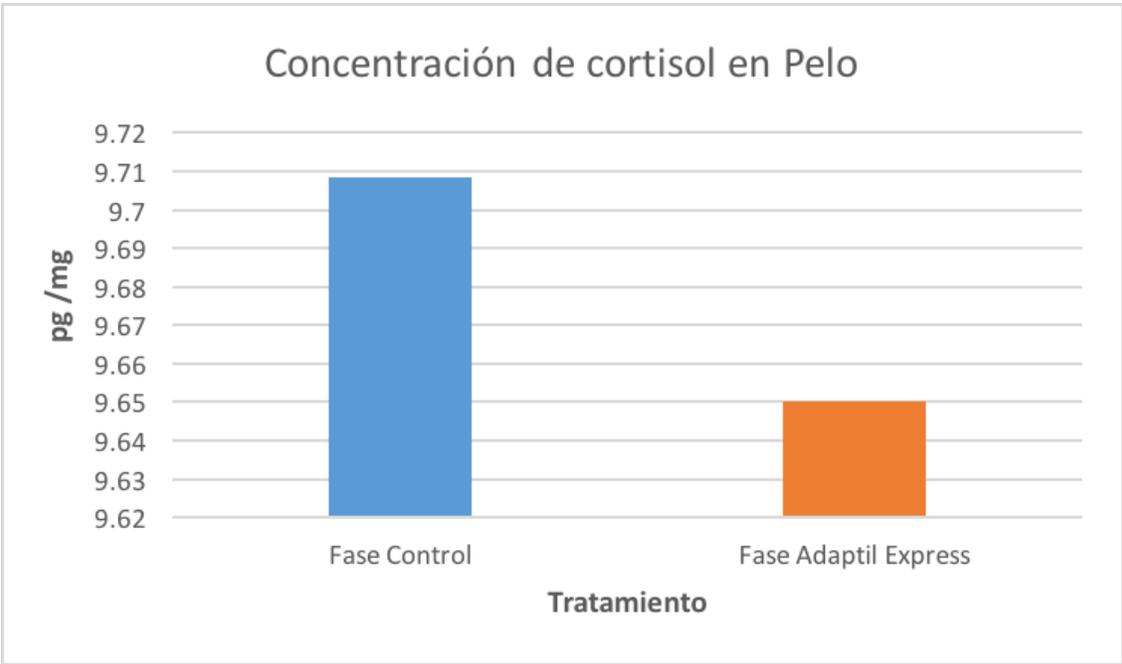


Figura 15. Concentración de Cortisol en Pelo con y sin Nutraceutico

## V. DISCUSION

En las últimas dos décadas, la utilización de nutraceuticos ha recibido mucha atención a nivel científico y en la sociedad (Ting *et al.*, 2014). Los propietarios de mascotas se preocupan cada vez más no solo de alimentar a sus mascotas, sino cómo y con qué las alimentan (Okin, 2017). Varios son los reportes sobre nutraceuticos y comportamiento en perros, pero al conocimiento de los autores, este es el primer estudio que ha investigado el efecto de Adaptil® comprimidos express en un grupo de perros basándose tanto un indicador fisiológico como uno comportamental para evaluar su efecto.

### 5.1. Diseño experimental

En ensayos clínicos se ha reportado que existen factores que pueden afectar la respuesta a los nutraceuticos (Bash, 2015) por ejemplo la especie animal y la edad. Ello atribuible a diferencias metabólicas de absorción o eliminación, pero también a factores intrínsecos del animal que aún no han sido claramente identificados (Head, 2008). En nuestro estudio la edad no fue un factor de inclusión o exclusión, pero todos los perros eran adultos y de la misma raza. (Araujo *et al.*, 2010). Otros trabajos han incluido perros de distintas razas, edades (DeNapoli *et al.*, 2000), estado reproductivo y dietas (Sherman, 2008)

### 5.2. Administración del nutraceutico Adaptil

Los nutraceuticos que se comercializan varían en cuanto a composición y concentración (Beata *et al.*, 2007; DeNapoli *et al.*, 2000). Adaptil express® se ofrece a los pacientes una vez al día, mientras que otros comprimidos comerciales con nutraceuticos se administra dos veces por día, lo cual puede reducir el compromiso de administrar el comprimido y reducir las probabilidades de éxito del tratamiento.

La correlación entre los efectos positivos de los nutraceuticos y su tiempo de uso también ha sido documentada (Haupt, 2003). Se han establecido periodos experimentales que van de los 10 a los 63 días (Head *et al.*, 2008) (Sechi *et al.*, 2017). En nuestro estudio la administración se realizó cinco días a la semana durante 3 semanas, ya que la administración de Adaptil express supone la obtención del efecto ansiolíticos en un periodo máximo de dos horas. Esta variedad en los estudios pudiera dificultar determinar la pauta de administración (Di Cerbo, *et al.*, 2017b) (Beata *et al.*, 2007).

### 5.3. Test de acercamiento

El uso de Adaptil comprimidos en nuestro estudio no se reflejaron cambios en el comportamiento de los beagles ante la presencia y cercanía de un individuo entre tratamientos. En general se mostraron interesados en la presencia de la persona y en la búsqueda de interacción. Esto puede

deberse a que al estar en instalaciones universitarias, son perros habituados a la presencia de personas diferentes continuamente. Usando también perros de laboratorio pero con miedo hacia personas desconocidas (Araujo *et al.*, 2010) mostraron una mayor interacción con al ingerir tabletas de un nutraceutico con L-teanina.

#### 5.4. Observación de la Conducta

En el caso del el nutraceutico utilizado en esta tesis, hubo un efecto significativo en varias conductas (“stand”, “stand on rear legs” “sit”, “explore”, “hide”, “lip licking”, “yawn”, “bounce” y “jump”). La ingesta de una dieta comercial con varios nutracéuticos pareció ser eficaz en la reducción de comportamiento relacionado con la ansiedad (Kato, 2012), aunque los mismos autores no excluyen un posible efecto placebo atribuible al haber participación de los propietarios. Otros autores han reportado que algunos nutracéuticos tienen efecto en parámetros fisiológicos pero no en la conducta (Vassalotti *et al.*, 2017). En nuestro estudio no tuvimos grupo control y tratamiento, sino que cada animal pasó por ambas etapas del experimental.

Una de las categorías donde hubo diferencia entre tratamientos fue la relativa a conductas orales. El lamido de labios (LL) en perros puede ser provocado o asociado a contextos negativos. Suele ser una respuesta ante situaciones de incertidumbre física o social, incluso ante expresiones faciales negativas de humanos (Albuquerque, 2018). En conjunto con bostezo puede ser una conducta que ayude a gestionar el estrés (Shiverdecker *et al.*, 2013 ). Ambas conductas parecen reducirse con el uso de psicofármacos (Sinn, 2018) o la L-teanina (Sherman, 2008) en perros con fobias a ruidos.

La conducta “hiding” aumentó durante la T2, probablemente por una falla en el diseño experimental al no incluir tratamiento placebo en la T1. Las razones para que un perro se esconda pueden ser varias, entre ellas presencia de un desconocido, ansiedad por ruidos, deseos de protección, aislamiento social, etc (Beaver, 2009). Durante la T2 el investigador entraba cada día aproximadamente a la misma hora a dar el nutraceutico a los animales, interacción que no ocurrió durante la T1. O bien, deberse a factores o situaciones fuera del alcance del estudio sucedidas fuera de las horas de observación.

En nuestro estudio, el etograma de los perros muestra más conductas de exploración, repetitivas y media de tiempo en la que en animal estaba parado sobre las patas traseras. En personas, está reportado que el triptófano promueve el sueño cuando se administra en dosis bajas (Orlando, 2018) (Young, 2002). Los perros alimentados con una dieta baja en proteínas y suplementos de triptófano han mostrado menos conductas agresivas (DeNapoli *et al.*, 2000) o relacionadas a estrés (Orlando, 2018). Y en perros temerosos se ha reportado una disminución en el metabolismo del triptófano plasmático y un aumento en sus metabolitos (Puurunen, 2016). Aunque otros estudios no han encontrado relación entre este elemento y la conducta (Bosch, 2009). Ello puede sugerir, que los perros estaban menos apáticos a su alrededor y mostraban más conductas activas, o bien, que el diseño de las instalaciones, no es el adecuado para que los animales, sobretodo los de mayor edad, descansen apropiadamente, según estudios de Döring (2018).

La L-teanina se ha usado en conjunto con fármacos en la reducción de tumores (Matsumoto, 2007), para modular la respuesta de fobia al ruido (Sherman, 2008) y la ansiedad relacionada con tormentas (Pike, 2015). A pesar de que sí se ha observado un efecto en las concentraciones plasmáticas de serotonina, dopamina y  $\beta$ -endorfinas (Sechi *et al.*, 2017) usando alimentos comerciales enriquecidos con este nutriente, los análisis comportamentales no han tenido una variación significativa entre tratamientos.

Se sabe que hasta 3.000 mg de inositol libre/kg de alimento completo seco podría considerarse seguro para perros. Pero no hay suficientes datos en la literatura de animales de compañía para sacar conclusiones sobre sus requerimientos, esencialidad o beneficio de su adición a la dieta (Houpt, 2003). Hay sólo dos estudios reportados, pero sus resultados son poco extrapolables a la población general canina. Esto debido a que en uno se utilizaron dosis muy bajas de inositol y en el otro se usaron perros diabéticos (FEEDAP, 2016). Al ser un nutriente relacionado con el metabolismo bacteriano, varios factores pueden afectar su metabolismo (Vilson *et al.*, 2018).

#### **5.4.1. Toma de muestra de pelo y determinación de concentración de cortisol**

En este estudio se trabajó con el cortisol capilar debido a que ha sido ampliamente estudiado durante los últimos años y se correlaciona positivamente con otras matrices en perros (Roth, 2016). Se ha validado como un biomarcador confiable para evaluar a largo plazo la actividad del eje HPA (Accorsi *et al.*, 2008; Mastromonaco, 2014) a veces en ventanas de tiempo virtualmente imposible de cubrir adecuadamente utilizando otras muestras (Stalder, 2012), o segmentadas para proporcionar un registro retrospectivo (Russell, 2012). Sin embargo, solo Sechi *et al.*, (2017) han demostraron que una dieta suplementada con L-teanina L-triptófano y fitoelementos disminuyó las concentraciones de noradrenalina y cortisol en un grupo de perros.

Bennett (2010) reportó que en perros que viven en su hogar, las [CP] y [CS] se correlacionan positivamente, sin estar condicionados por atributos como raza, edad, peso o estado reproductivo. Aunque sí se han mostrado fluctuaciones estacionales y en aquellos que viven solos (Hamel *et al.*, 2011). Esto es relevante para nuestro estudio, ya que algunos de los perros analizados viven con compañero de jaula y otros no. Sin embargo la estación no fue considerada en nuestro estudio debido a que ambas fases (T1 y T2) se realizaron en otoño.

Una consideración metodológica importante a tener en cuenta es el sitio del cuerpo para obtención de la muestra. En perros, se ha reportado una fuerte correlación entre diferentes sitios del cuerpo y tipos de pelo como ondas o rizos (Stalder, 2012). Elegimos la zona de pelo de pecho y cuello por ser un sitio poco contaminada con el auto acicalado y a la alta consistencia en las [C] demostrada entre ellas (Roth *et al.*, 2016). Para evitar la introducción de sesgo, se eligió muestrear sólo pelo blanco, aunque el laboratorio reportó la presencia de algunos pelos marrones en la muestra de 2 individuos. Se realizó la obtención de muestra con maquina rasuradora para evitar incluir folículos pilosos y evitar una posible contaminación de cortisol sanguíneo (Meyer, 2012). De esta manera lleva dos semanas mínimamente para que un nuevo pelo formado en el folículo alcance el cuero cabelludo (Baciu *et al.*, 2015). Aunque este periodo fue completado durante el desarrollo de las

etapas de este estudio, en algunos perros no fue suficiente para que la zona se volviera a cubrir totalmente de pelo, notándose una gran variación entre individuos.

Los niveles de cortisol se correlacionan negativamente con las interacciones humanas amigables (las interacciones positivas reducen estrés) y positivamente con la agresión dirigida a extraños (Horváth, 2008). Aunque en nuestro estudio se evitó la interacción innecesaria con los perros, puede haber sido un factor a tomarse en cuenta debido a que diariamente había una cercanía a ellos para administrarles el comprimido durante la T2 y no se usó comprimido placebo. Al haber estado conviviendo con ellos durante dos experimentales y ser este la última fase, pueden haberse habituado a la presencia de la investigadora y por ello no mostrar diferencia entre tratamientos.

## VI. CONCLUSIONES

En este estudio, el uso de Adaptil comprimido (AC) express parece tener un efecto significativo en conductas orales, repetitivas y de postura de un grupo de perros viviendo en un colectivo. Específicamente en las comportamientos: *“standing”*, *“standing in rear legs”*, *“sit”*, *“exploring”*, *“hide”*, *“lip licking”*, *“yawn”* y *“bouncing”*.

En contraste a la suposición inicial, AC aumentó conductas motoras y repetitivas. Pero disminuyó dos orales relacionadas a emociones negativas. Esto puede sugerir que el comprimido disminuyó la apatía de los perros por el entorno su entorno o que no tuvo un efecto sobre la reducción en los niveles de estrés de perros en colectivos.

No se observó una diferencia en la concentración de cortisol en pelo entre tratamientos. Aunque es un indicador validado en perros para determinar estrés en condiciones crónicas, parece haber factores que pueden alterarla cuyo efecto aún permanece poco estudiado en esta especie. Los resultados obtenidos en este estudio, enfatizan la importancia de utilizar una combinación de indicadores en los estudios etológicos.

Lo reportado en diferentes estudios con otras especies animales y los nuestros, indican que existe el potencial para modificar la conducta de los perros a través de los nutraceuticos. Pero, para que estos sean una alternativa segura, efectiva y predecible, son fundamentales más ensayos clínicos que esclarezcan su biodisponibilidad, dosis, combinación con diferentes nutraceuticos o dietas y posibles contraindicaciones.

## VII. BIBLIOGRAFÍA ADAPTIL NUTRACÉUTICO

- Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., & Seren, E. (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology*, 155(2), 398–402. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.07.002>
- Albuquerque, N., Guo, K., Wilkinson, A., Resende, B., & Mills, D. S. (2018). Mouth-licking by dogs as a response to emotional stimuli. *Behavioural Processes*, 146(June 2017), 42–45. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.11.006>
- Araujo, J. A., de Rivera, C., Ethier, J. L., Landsberg, G. M., Denenberg, S., Arnold, S., & Milgram, N. W. (2010). ANXITANE® tablets reduce fear of human beings in a laboratory model of anxiety-related behavior, 5(5), 268–275. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2010.02.003>
- Baciu, T., Borrull, F., Aguilar, C., & Calull, M. (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, 856, 1–26. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.051>
- Bash, E. (2015). Feromonas. *PhD Proposal*, 1, 3–14. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Beata, C., Beaumont-Graff, E., Diaz, C., Marion, M., Massal, N., Marlois, N., et al. (2007). Effects of alpha-casozepine (Zylkene) versus selegiline hydrochloride (Selgian, Anipryl) on anxiety disorders in dogs, 2(5), 175–183. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2007.08.001>
- Beaver, B. V. (2009). *Canine Behavior* (2nd ed., pp. 1–319). Missouri: Saunders Elsevier.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A., De Vries, H. W., & Mol, J. A. (2000). Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs, 9, 49–62.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior*, 30(3), 272–279. <http://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0033>
- Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences, 39(3), 171–180. <http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.003>
- Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 758–774. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.033>
- Bosch, G. (2009, February 3). *Can diet composition affect behaviour in dogs?* Retrieved from <http://edepot.wur.nl/2619>
- Brown, S. A. (2004). Functional foods and the urinary tract. *Vet Clin Small Anim*, 34(1), 173–185. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.09.003>

- Casal, N., Manteca, X., Peña L, R., Bassols, A., & Fàbrega, E. (2017). Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs, *19*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.01.002>
- Case, L., Daristotle, L., Hayek, M., & Foess Raash, M. (2011). Canine and feline nutrition (Tercera Edición, pp. 1–542). Missouri: Mosby Elsevier. Retrieved from <http://b-ok.xyz/book/836623/aac1f8>
- Center, S. A. (2004). Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Vet Clin Small Anim*, *34*(1), 67–172. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.09.015>
- Ceva. (2015, April 23). Pheromone-based therapies revamped. *Veterinary Record*. <http://doi.org/10.1136/vr.h2192>
- Ciribé, F., Panzarella, R., Pisu, M. C., Di Cerbo, A., Guidetti, G., & Canello, S. (2018). Hypospermia Improvement in Dogs Fed on a Nutraceutical Diet. *The Scientific World Journal*, *2018*(2), 1–4. <http://doi.org/10.1155/2018/9520204>
- Coppock, R. W., & Dziwenka, M. (2016). Green Tea Extract (pp. 633–652). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00046-2>
- Davenport, M. D., Tiefenbacher, S., Lutz, C. K., Novak, M. A., & Meyer, J. S. (2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology*, *147*(3), 255–261. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.01.005>
- de Godoy, M. R. C., Hervera, M., Swanson, K. S., & Fahey, G. C., Jr. (2016). Innovations in Canine and Feline Nutrition: Technologies for Food and Nutrition Assessment, *4*(1), 311–333. <http://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111414>
- DeNapoli, J. S., Dodman, N. H., Shuster, L., Rand, W. M., & Gross, K. L. (2000). Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs, *217*(4), 504–508. <http://doi.org/10.2460/javma.2000.217.504>
- Destefais, S., Giretto, D., Muscolo, M. C., Centenaro, S., Guidetti, G., & Canello, S. (2017). Clinical evaluation of a nutraceutical diet as an adjuvant to pharmacological treatment in dogs affected by epiphora. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0841-2>
- Di Cerbo, A., Centenaro, S., Terrazzano, G., Beribè, F., Laus, F., Cerquetella, M., et al. (2016). Clinical evaluation of a antiinflammatory and antioxidant diet effect in 30 dogs affected by chronic otitis externa: preliminary results. *Veterinary Research Communication*, *40*, 29–38. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0841-2>
- Di Cerbo, A., Morales-Medina, J. C., Palmieri, B., Pezzuto, F., Cocco, R., Flores, G., & Iannitti, T. (2017a). Functional foods in pet nutrition\_ Focus on dogs and cats, *112*(March), 161–166. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.020>
- Di Cerbo, A., Sechi, S., Canello, S., Guidetti, G., Fiore, F., & Cocco, R. (2017b). Behavioral Disturbances: An Innovative Approach to Monitor the Modulatory Effects of a Nutraceutical Diet. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (119), e54878–9. <http://doi.org/10.3791/54878>

- Döring, D., Backofen, I., Schmidt, J., Bauer, A., & Erhard, M. H. (2018). Use of beds by laboratory beagles. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 28, 6–10. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.07.004>
- FEEDAP. (2016). Safety and efficacy of inositol as nutritional additive for dogs and cats, 14(6), 21–29. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4511>
- Gazzano, A., Ogi, A., Torracca, B., Mariti, C., & Casini, L. (2018). Plasma Tryptophan/Large Neutral Amino Acids Ratio in Domestic Dogs Is Affected by a Single Meal with High Carbohydrates Level, 8(5), 63–68. <http://doi.org/10.3390/ani8050063>
- Guy, R. C. E. (2016). *Pet Foods* ☆ (pp. 1–5). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00140-2>
- Hamel, A. F., Meyer, J. S., Henchey, E., Dettmer, A. M., Suomi, S. J., & Novak, M. A. (2011). Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(3-4), 382–385. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2010.10.019>
- Head, E., Rofina, J., & Zicker, S. (2008). Oxidative stress, aging and CNS disease in the canine model of human brain aging, 38(1), 167–vi.
- Hennessy, M. B. (2013). Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review, 149(1-4), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.004>
- Horváth, Z., Dóka, A., & Miklósi, Á. (2008). Affiliative and disciplinary behavior of human handlers during play with their dog affects cortisol concentrations in opposite directions. *Hormones and Behavior*, 54(1), 107–114. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.02.002>
- Houpt, K. A., & Zicker, S. (2003). Dietary effects on canine and feline behavior, 33, 405–416.
- Kanakubo, K., Fascetti, A. J., & Larsen, J. A. (2015). Assessment of protein and amino acid concentrations and labeling adequacy of commercial vegetarian diets formulated for dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(4), 385–392. <http://doi.org/10.2460/javma.247.4.385>
- Kato, M., Miyaji, K., Ohtani, N., & Ohta, M. (2012). Effects of prescription diet on dealing with stressful situations and performance of anxiety-related behaviors in privately owned anxious dogs, 7(1), 21–26. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2011.05.025>
- Kirk, C. A. (2018). Top Nutraceuticals in Pet Foods and Practice, 1–4.
- Luengo, E. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos (pp. 1–93). Acción Médica.
- Mallikarjun, V., & Swift, J. (2016). Therapeutic Manipulation of Ageing: Repurposing Old Dogs and Discovering New Tricks. *EBioMedicine*, 14, 24–31. <http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.020>
- Manteca, X. (2011). Nutrition and behavior in senior dogs. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(1), 33–36. <http://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.01.003>

- Mastromonaco, G. F., Gunn, K., McCurdy-Adams, H., Edwards, D. B., & Schulte-Hostedde, A. I. (2014). Validation and use of hair cortisol as a measure of chronic stress in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Conservation Physiology*, 2(1), cou055–12. <http://doi.org/10.1093/conphys/cou055>
- Matsumoto, M., Ishikawa, H., & Matsumoto, H. (2007). Antineoplastic effect of locally injected ivermectin, L-theanine and pyridoxine hydrochloride in canine mast cell tumours., 60(4), 319–322. Retrieved from [https://www-cabdirect-org.are.uab.cat/cabdirect/abstract/20073220252?q=\(L-Theanine+dogs\)](https://www-cabdirect-org.are.uab.cat/cabdirect/abstract/20073220252?q=(L-Theanine+dogs))
- Meyer, J. S., & Novak, M. A. (2012). Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*, 153(9), 4120–4127. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1226>
- Meyer, J., Novak, M., Hamel, A., & Rosenberg, K. (2014). Extraction and Analysis of Cortisol from Human and Monkey Hair, (83), 1–6. <http://doi.org/10.3791/50882>
- Michel, K. E. (2006). Unconventional diets for dogs and cats. *Vet Clin Small Anim*, 36(6), 1269–81–vi–vii. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.08.003>
- Milgram, N., Muggenburg, B. A., Holowachuk, D., Murphey, H., Estrada, J., Ikeda-Douglas, C. J., et al. (2002). Landmark discrimination learning in the dog: effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy, 26, 679–695.
- Nuti, V. (2018). Compulsive acral dermatitis in a mongrel dog. *Dog Behaviour*, 4(2), 1–2. <http://doi.org/10.4454/db.v4i2.88>
- Okin, G. (2017). Environmental impacts of food consumption by dogs and cats, 12(8), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal>
- Orlando, J. M. (2018). Behavioral Nutraceuticals and Diets, 48(3), 473–495. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.012>
- Pageat, P. (2010). Pheromotherapy in dogs.
- Parr, J. M., & Remillard, R. L. (2014). Handling alternative dietary requests from pet owners.
- Pérez Leonard, H. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *Icidca*, XL(3), 20–28.
- Pike, A. L., Horwitz, D. F., & Lobprise, H. (2015). An open-label prospective study of the use of l-theanine (Anxitane) in storm-sensitive client-owned dogs, 10(4), 324–331. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.04.001>
- Puurunen, J., Tiira, K., Lehtonen, M., Hanhineva, K., & Lohi, H. (2016). Non-targeted metabolite profiling reveals changes in oxidative stress, tryptophan and lipid metabolisms in fearful dogs, 12(1), 467–413. <http://doi.org/10.1186/s12993-016-0091-2>
- Radosta, L. (2012). Anxiolytic supplements, 25(2), 1–3.

- Redfern, A., Suchodolski, J., & Jergens, A. (2017). Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *The Veterinary Record*, *181*(14), 370–370. <http://doi.org/10.1136/vr.103826>
- Roth, L. S. V., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, *6*(December 2015), 19631–7. <http://doi.org/10.1038/srep19631>
- Roudebush, P., Davenport, D. J., & Novotny, B. J. (2004). The use of nutraceuticals in cancer therapy. *Vet Clin Small Anim*, *34*(1), 249–269. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.09.001>
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589–601. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
- Santini, A., Tenore, G. C., & Novellino, E. (2017). Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *96*, 53–61. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.003>
- Schneider, L. (2013). Nutraceuticals and their use in veterinary practices. *The New Zealand Veterinary Nurse*, 8–11. Retrieved from <https://www.google.es/>
- Sechi, S., Di Cerbo, A., Canello, S., Guidetti, G., Chiavolelli, F., Fiore, F., & Cocco, R. (2017). Effects in dogs with behavioural disorders of a commercial nutraceutical diet on stress and neuroendocrine parameters. *The Veterinary Record*, *180*(1), 18–18. <http://doi.org/10.1136/vr.103865>
- Sherman, B. L., & Serpell, J. A. (2008). Training Veterinary Students in Animal Behavior to Preserve the Human–Animal Bond. *Jvme*, *35*(4), 496–502. Retrieved from <https://www.researchgate.net/>
- Sinn, L. (2018). Advances in Behavioral Psychopharmacology. *Vet Clin Small Anim*, *48*(3), 457–471. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.011>
- Sinteoan, D. (2018). Nutraceutical support for dogs and cats with gastrointestinal problems. *Veterinary Ireland Journal*, *7*, 248–250.
- Stalder, T., & Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair, state of the art and future directions. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(7), 1019–1029. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.02.002>
- Stellato, A. C., Flint, H. E., Widowski, T. M., Serpell, J. A., & Niel, L. (2017). Assessment of fear-related behaviours displayed by companion dogs (*Canis familiaris*) in response to social and non-social stimuli, *188*, 84–90. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.12.007>
- Tallo-Parra, O., Manteca, X., Sabes-Alsina, M., Carbajal, A., & Lopez-Bejar, M. (2015). Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal : an International Journal of Animal Bioscience*, *9*(6), 1059–1064. <http://doi.org/10.1017/S1751731115000294>
- Thombre, A. G. (2004). Oral delivery of medications to companion animals: palatability considerations, *56*(10), 1399–1413. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.012>

Thompson, A. (2008). Ingredients: where pet food starts. *Tcam*, 23(3), 127–132. <http://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.04.004>

Ting, Y., Jiang, Y., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2014). Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 112–128. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.010>

Vandeweerd, J. M., Coisson, C., Clegg, P., Cambier, C., Pierson, A., Hontoir, F., et al. (2012). Systematic review of efficacy of nutraceuticals to alleviate clinical signs of osteoarthritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 448–456. <http://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00901.x>

Vassalotti, G., Musco, N., Lombardi, P., Calabrò, S., Tudisco, R., Mastellone, V., et al. (2017). Nutritional management of search and rescue dogs. *Journal of Nutritional Science*, 6, 32. <http://doi.org/10.1017/jns.2017.47>

Vicinanza, V. (2013). ¿Puede influir la alimentación en el comportamiento? Últimos resultados y nuevas fronteras de investigación. *Boletín de Etología GRETA*.

Vilson, Å., Ramadan, Z., Li, Q., Hedhammar, Å., Reynolds, A., Spears, J., et al. (2018). Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS ONE*, 13(3), e0193507–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0193507>

Young, S. N. (2002). Clinical nutrition: 3. The fuzzy boundary between nutrition and psychopharmacology, *166*(2), 1–5.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

### 8.1. Test de acercamiento

El contexto suele ser más determinante que la persona en sí o el estímulo aplicado para evaluar la reacción de un perro ante un desconocido (Döring *et al.*, 2017) Cuando los perros se encuentran en su ambiente y con los congéneres rutinarios, como fue el caso de nuestro estudio, los test de acercamiento pueden no reflejar la respuesta que ese mismo animal tendría al estar solo con la persona de la prueba en una habitación desconocida. (Pullen, 2012) y (Döring *et al.*, 2017) observaron que la respuesta de los perros Beagles en colectivos durante pruebas de encuentro fueron muy sociables y amigables, sin diferencias entre el comportamiento hacia el cuidador familiar y la persona desconocida. Esto mismo apreciamos en los resultados del test de nuestro estudio. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos control y el uso de Adaptil spray o nutraceutico. La mayoría de los perros mostraron un marcado interés en establecer contactos con las personas del test.

### 8.2. Uso de la determinación de cortisol en pelo como indicador de estrés crónico en perros

La determinación de cortisol en el pelo puede ser un medio útil para evaluar estrés crónico en los perros (McGowan, 2018). Sin embargo, hay factores que pueden alterarla cuyo efecto aún permanece poco estudiado en esta especie (Iwamura, 1996), (Roth, 2016) (Beerda, 1998) (Taff, 2018). El uso de los dos ansiolíticos naturales usados en nuestro estudio, mostró un aumento estadísticamente significativo en la [CP] con el uso de la feromona sintética y ninguna diferencia entre fases con el uso de los nutraceuticos. Esto podría sugerir principalmente dos situaciones:

- Que la presencia de la investigadora provocó excitación entre los beagles y ello aumentó la concentración de cortisol. Esto es contrario a lo reportado en interacciones positivas entre humanos y perros (Coppola, 2006) (Willen, 2017); pero puede deberse a que al no presentarse satisfacción de la demanda de atención o interacción con ellos, las concentraciones de esta hormona no se redujeran tal y como está reportado (Campos, 2012).
- A medida que el estrés se vuelve más crónico, hay una mayor posibilidad de que la regulación del sistema HPA y esto sugiere que los perros se adaptan al entorno de la perrera a lo largo del tiempo (Hennessy, 2013) (Nicola, 2009). El perro que tenía menos tiempo en las instalaciones de nuestro estudio había pasado tres años en ellas, por lo que pueden haberse habituado a las condiciones de estas. Sin embargo otros autores encontraron que

la correlación entre el cortisol y el número de días que un perro permanece en un refugio de animales no parecen ser consistentes (Mills, 2014)

Se han encontrado resultados no esperados en la [CP] atribuibles a factores intrínsecos del animal. Boissy, (2007) reportó que no existen diferencias en las en cuanto a sexo, tamaño o edad o estado reproductivo (Bennett, 2010). Beerda (1999) menciona la raza como probable influencia. Pero todos coinciden en que las diferencias individuales son sustanciales. (Burn, 2017) por ejemplo, reportó que el temperamento individual marca diferencias en la tasa metabólica y [C]. Y Willen *et al.*, (2017) que no es diferente entre perros callejeros y perros que solían tenían propietario. Un nivel alto en las [C] puede representar las diferencias individuales en el estilo de afrontamiento del estrés, experiencias de aprendizaje previos o diferencias en la respuesta emocional al encierro. Aunque los individuos se enfrenten a presiones extrínsecas similares, es muy probable que las diferencias individuales en [C] reflejen diferencias reales de acuerdo al temperamento de cada animal (Rakotoniaina *et al.*, 2017)). Con la idea de extrapolar los resultados obtenidos en este estudio a la población canina en general que vive en colectivos, los resultados de cortisol se analizaron y muestran de manera grupal, pero si se siguiera la respuesta individual de cada perro quizá se pudieran observar tales efectos.

### **8.3. Uso de ansiolíticos naturales para mejorar el bienestar de perros en colectivos**

La observación de las conductas para determinar estrés en animales puede llegar a ser una herramienta muy útil, pero su interpretación cobra más rigor cuando se determinan también medidas fisiológicas (Hubrecht, 1993). De hecho, muchos diagnósticos de un déficit de salud y bienestar comienzan con la observación de una conducta anómala por parte del propietario del perro o del veterinario (Haupt, 2003).

La observación y registro de las conductas de los perros en nuestro estudio, fue realizado mediante un circuito cerrado, ya que está demostrado que el contacto humano puede aumentar enormemente la fiabilidad de los datos derivados de animales emocionales (en este caso los perros), cuyos parámetros fisiológicos demuestran cambios sincrónicos significativos con dicho contacto. (Gauvin, 2006).

Uno de los resultados más señalados de esta investigación y en general de aquellas que han usado DAP es la disminución de vocalizaciones. En promedio, los perros ladran 3.1 veces en 24 horas (rango de 0 - 8). Cada episodio dura una media de 50.9 segundos (rango 1 -302) (Beaver, 2009). Sin embargo, los beagles suelen ladrar en una proporción superior a la media (Beaver, 2009), incluso desde cachorros (K. Taylor, 2007). Un Beagle ladró 907 veces en 10 minutos (Coppola, 2010). Tal como lo vimos en el estudio, Beaver, (2009) reporta que los perros más viejos suelen comenzar a ladrar sin ninguno de los estímulos precipitantes habituales y el ladrido de varios individuos desencadena el 38.1% de los episodios de ladridos en todos los demás individuos del colectivo. Todo ello cobra relevancia cuando se analiza el efecto obtenido con la aplicación de Adaptil spray. Esta

raza es una de las más usadas en investigación, por lo que la salud y en general su bienestar y el del personal que los frecuenta puede verse favorecido (Hart, 2018; Kiddie, 2015) (Coppola *et al.*, 2010).

Se ha reportado que los perros machos mostraron más conductas indicativas de pobre bienestar que las hembras. En nuestro estudio se incluyeron perros de ambos sexos sin diferenciar los resultados entre sexo (Scullion, 2017). Por lo que este podría ser un principio a tomar en cuenta para próximos estudios. Existen especies animales que presentan un tamaño mayor del OVN en machos y en una estación específica del año (Woodley, 2010). Ya que el dimorfismo sexual en respuesta a las feromonas es común en todo el reino animal (Stowers, 2010), no se pudo descartar *de facto* que esto pase en perros, aunque su evidencia científica no exista por ahora.

Específicamente, el uso de Adaptil comprimido express mostró tener un efecto significativo en la conductas: standing, standing rear, sitting, exploring, hide, lip Licking, yawn, bouncing y jumping. Aunque el efecto a los nutraceuticos aún no está bien estudiado en perros, la exposición de su efecto sobre el comportamiento es relevante. Sin duda las consecuencias de su uso pueden estar influenciadas por causas multifactoriales, como la dieta, la edad, el tiempo de administración, el estado reproductivo o la microbiota intestinal (Coppock, 2016). Factores que deberán ser estudiados a más profundidad. Debe tomarse en cuenta que con su uso para la reducción de conductas asociadas a estrés o ansiedad se promueve un proceso moderado a largo plazo (Ting, 2014) de preferencia en conjunto con otras estrategias. Por ello es importante establecer expectativas realistas para el éxito en su uso.

La exposición a la feromona sintética Adaptil causó un efecto significativo en las conductas “standing rear”, “pacing”, ladridos y vocalizaciones en general. Y se incrementaron las interacciones entre individuos y el juego con perro y juguete. En nuestro estudio se contó con perros de 9 o 10 años que pudiera considerarse como viejos de acuerdo a la esperanza de vida de la raza Beagle, que parecen tener menos conducta de juego que los jóvenes. Además, el envejecimiento se ha relacionado con anosmia y disminución en la percepción quimiosensitiva (Faragó, 2010). Pero a pesar de estas dos condiciones, con la aplicación de DAP parece haberse obtenido resultados prometedores.

Otras aproximaciones no farmacológicas para mejorar el bienestar de perros en colectivos (Taylor, 2016) (Bowman, 2017) (Wells, 2009) no han reportado efectos significativos entre su uso y el uso de un placebo en conductas relacionadas a estrés, han provocado habituación, o incluso han causado un efecto sedativo.

Minimizar el estrés de perros que se enfrentan a los factores que se viven en colectivos no debe ser una opción, sino un estándar. El estrés continuo no es deseable por sus efectos adversos sobre la función inmunológica, la tasa de recuperación de cualquier enfermedad o procedimiento que en ellos se realice y en general por razones de bienestar. Los efectos perjudiciales de los factores estresantes que viven los perros en un ambiente colectivo pueden mitigarse al proporcionar productos ansiolíticos como las feromonas y los nutraceuticos.

A pesar de que en muchas de las conductas observadas no se detectó evidencia estadísticamente significativa de diferencia entre los tratamientos dentro del período experimental, cualquier elemento que mejore el bienestar animal de individuos bajo el cuidado humano debería ser tomado en cuenta dado el significado que esto tiene para su vida y las funciones que en ellas desempeñan. Por ello también, se justifica la realización de investigaciones adicionales usando estos productos.

## BIBLIOGRAFÍA DISCUSIÓN GENERAL

- Beaver, B. V. (2009). *Canine Behavior* (2nd ed., pp. 1–319). Missouri: Saunders Elsevier.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hoof, J. A., De Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioral, saliva cortisol and heart rate response to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *58*, 365–381. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.024>
- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1999). Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Applied Animal Behaviour Science*, *66*(2), 233–242. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00289-3](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00289-3)
- Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences, *39*(3), 171–180. <http://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.003>
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M. B., Moe, R. O., Spruijt, B., Keeling, L. J., et al. (2007). *Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare* (Vol. 92).
- Bowman, A., Dowell, F. J., & Evans, N. P. (2017). “The effect of different genres of music on the stress levels of kennelled dogs.” *Applied Animal Behaviour Science*, *171*, 207–215. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.024>
- Burn, C. C. (2017). Bestial boredom : a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation, *130*, 141–151. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.06.006>
- Campos, D. J. M. (2012, February 6). *Valoración del carácter y el bienestar animal en un albergue canino municipal*. (R. López Rodríguez & J. M. Molleda Caronell, Eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/7288>
- Coppock, R. W., & Dziwenka, M. (2016). Green Tea Extract (pp. 633–652). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00046-2>
- Coppola, C. L., Enns, R. M., & Grandin, T. (2010). Noise in the Animal Shelter Environment : Building Design and the Effects of Daily Noise Exposure Noise in the Animal Shelter Environment : Building Design and the Effects of Daily Noise Exposure, *8705*(May 2014), 37–41. <http://doi.org/10.1207/s15327604jaws0901>
- Coppola, C. L., Grandin, T., & Enns, R. M. (2006). Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs?, *87*(3), 537–541. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.12.001>
- Döring, D., Haberland, B. E., Bauer, A., Dobenecker, B., Hack, R., Schmidt, J., & Erhard, M. H. (2017). Consistency in behavior: Evaluation of behavior tests in laboratory beagles. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, *21*, 59–63. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.07.002>

- Faragó, T., Pongrácz, P., Range, F., Virányi, Z., & Miklósi, Á. (2010). "The bone is mine": affective and referential aspects of dog growls, 79(4), 917–925. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.01.005>
- Gauvin, D. V., Tilley, L. P., Smith, F. W. K., Jr., & Baird, T. J. (2006). Electrocardiogram, hemodynamics, and core body temperatures of the normal freely moving laboratory beagle dog by remote radiotelemetry. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 53(2), 128–139. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2005.11.004>
- Hart, B. L., Hart, L. A., Thigpen, A. P., Tran, A., & Bain, M. J. (2018). The paradox of canine conspecific coprophagy. *Veterinary Medicine and Science*, 4(2), 106–114. <http://doi.org/10.1002/vms3.92>
- Hennessy, M. B. (2013). Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review, 149(1-4), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.09.004>
- Houpt, K. A., & Zicker, S. (2003). Dietary effects on canine and feline behavior, 33, 405–416.
- Hubrecht, R. (1993). A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs, 37(4), 345–361. [http://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90123-7](http://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90123-7)
- Iwamura, S., Koizumi, N., Matsubara, Y., Honjo, K., & Hirota, Y. (1996). Changes in the level of plasma cortisol, progesterone and total testosterone in developing hairless dogs. *J Vet Med Sci*, 60(11), 1899–1901. <http://doi.org/10.1271/bbb.60.1899>
- Kiddie, J., & Collins, L. (2015). Identifying environmental and management factors that may be associated with the quality of life of kennelled dogs (*Canis familiaris*), 167, 43–55. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.03.007>
- McGowan, R. T. S., Bolte, C., Barnett, H. R., Perez-Camargo, G., & Martin, F. (2018). Can you spare 15 min? The measurable positive impact of a 15-min petting session on shelter dog well-being, 1–0. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.02.011>
- Mills, D., Karagiannis, C., & Zulch, H. (2014). Stress-its effects on health and behavior: A guide for practitioners. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(3), 525–541. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.01.005>
- Nicola Rooney BSc, P. P., Samantha Gaines BSc, M. P., & Elly Hiby BSc, P. (2009). A practitioners guide to working dog welfare, 4(3), 127–134. <http://doi.org/10.1016/j.jveb.2008.10.037>
- Pullen, A. J., Merrill, R. J. N., & Bradshaw, J. W. S. (2012). The effect of familiarity on behaviour of kennel housed dogs during interactions with humans, 137(1-2), 66–73. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.12.009>
- Rakotoniaina, J. H., Kappeler, P. M., Kaesler, E., Hämäläinen, A. M., Kirschbaum, C., & Kraus, C. (2017). Hair cortisol concentrations correlate negatively with survival in a wild primate population. *BMC Ecology*, 17(1), 30–13. <http://doi.org/10.1186/s12898-017-0140-1>
- Roth, L. S. V., Faresjö, Å., Theodorsson, E., & Jensen, P. (2016). Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*,

- 6(December 2015), 19631–7. <http://doi.org/10.1038/srep19631>
- Scullion Hall, L. E. M., Robinson, S., Finch, J., & Buchanan-Smith, H. M. (2017). The influence of facility and home pen design on the welfare of the laboratory-housed dog. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *83*, 21–29. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.09.005>
- Stowers, L., & Logan, D. W. (2010). Sexual dimorphism in olfactory signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, *20*(6), 770–775. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.015>
- Taff, C. C., Schoenle, L. A., & Vitousek, M. N. (2018). The repeatability of glucocorticoids: A review and meta-analysis, *260*, 136–145. <http://doi.org/10.1016/j.ygcn.2018.01.011>
- Taylor, K., & Mills, D. S. (2007). A placebo-controlled study to investigate the effect of Dog Appeasing Pheromone and other environmental and management factors on the reports of disturbance and house soiling during the night in recently adopted puppies (*Canis familiaris*), *105*(4), 358–368. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.11.003>
- Taylor, S., & Madden, J. (2016). The Effect of Pet Remedy on the Behaviour of the Domestic Dog (*Canis familiaris*). *Animals*, *6*(11), 64–10. <http://doi.org/10.3390/ani6110064>
- Ting, Y., Jiang, Y., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2014). Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*, *7*(1), 112–128. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.010>
- Wells, D. L. (2009). Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review, *118*(1-2), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.01.002>
- Willen, R. M., Mutwill, A., MacDonald, L. J., Schiml, P. A., & Hennessy, M. B. (2017). Factors determining the effects of human interaction on the cortisol levels of shelter dogs, *186*, 41–48. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.11.002>
- Woodley, S. K. (2010). Pheromonal communication in amphibians. *Journal of Comparative Physiology a: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *196*(10), 713–727. <http://doi.org/10.1007/s00359-010-0540-6>

## CONCLUSIONES GENERALES

1. No se encontraron diferencias significativas entre los perros tratados con feromona o con nutracéutico y los perros control ante la presencia de un desconocido. Ello sugiere que encontrarse en un ambiente conocido puede ser más determinante que la presencia de un extraño.

2. La exposición a la feromona sintética redujo la presencia de conductas repetitivas asociadas a estrés crónico en perros, así como los ladridos y las vocalizaciones.
3. Las conductas asociadas a emociones positivas (interacción social y juego) aumentaron en respuesta a la feromona.
4. La concentración de cortisol en pelo aumentó durante la aplicación de feromona y no mostró cambios en respuesta al nutracéutico.
5. El nutracéutico aumentó la frecuencia de conductas motoras y disminuyó dos conductas orales asociadas a emociones negativas (bostezo y lamido de labios).
6. Los resultados de ambos estudios enfatizan la importancia de combinar indicadores de comportamiento y fisiológicos en los estudios cuyo objetivo es evaluar el bienestar de los animales.

## ANEXO A

### **Determinación de la [CP] según Tallo-Parra, et al., 2016.**

Para la extracción de cortisol capilar se pesan 200 miligramos de pelo de cada muestra y se colocan en un tubo cónico de 15 ml. Cada muestra se lava agregando 2,5 ml de isopropanol (2-propanol 99,5%, Scharlab SL, Sentmenat, España) y se agita a 1800 rpm durante 2,5 minutos para eliminar las fuentes de esteroides externos, pero evitando la pérdida de esteroides internos como sugiere Davenport (2006). El sobrenadante se separó por decantación y el proceso se repitió dos veces (tres lavados en total). Las muestras de pelo se dejaron secar completamente durante aproximadamente 36 horas a temperatura ambiente. Luego, el cabello se corta en fragmentos de <2 mm de longitud, se pesan 50 mg de cabello recortado y se colocan en un tubo eppendorf de 2 ml. Para cada muestra, se agregan 1.5 ml de metanol puro y las muestras se agitan a 100 rpm durante 18 horas a 30°C (Incubadora Ambiental G24, New Brunswick Scientific CO Inc., Edison, NJ, EE. UU.) hasta la extracción de esteroides. Después de la extracción, las muestras se centrifugan a  $7\ 000 \times g$  durante 2 minutos.

Posteriormente, 0.750 ml de sobrenadante se transfieren a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml y se colocan en un horno a 38 oC. Una vez que el metanol se evapora completamente (aproximadamente después de 24 horas), los extractos secos se reconstituyen con 0,2 ml de buffer EIA (KIT Cortisol ELISA; Neogen® Corporation, Ayr, Reino Unido) y se agitan durante 30 segundos. Finalmente las muestras se almacenan inmediatamente a -20 oC hasta su análisis.